



行政院衛生署八十八年度委託研究計畫

洛神花成分及保健機能之評估(二)
多酚成分對內生性一氧化氮誘發肝毒性作用之研究

委託研究成果報告

執行機構：私立中山醫學院

計畫主持人：曾翠華

研究人員：謝育津、林偉隆、劉春蘭、江惠卿

執行期限：87年7月1日至88年6月30日

目錄

摘要	3
前言	5
材料與方法	8
結果	19
討論	27
結論與建議	30
參考文獻	32
圖、表	37

中文摘要

本研究由洛神花茶製備多酚成份並分析其結構，體外試驗發現其具抗發炎及抗氧化等活性，再以 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠為實驗材料，觀察洛神花茶多酚成份：原兒茶酸(PCA)及洛神花花青素(HS-As)對內毒素(lipopolysaccharide;LPS)所造成的肝毒性是否具有抑制作用。由實驗中發現腹腔注射 10 mg/kg 的 LPS 6 小時後，大白鼠有一半死亡，而預先口服洛神花茶多酚成份(75mg/kg)可提高存活率，但原兒茶酸效果較洛神花花青素好。又腹腔注射 5mg/kg 的 LPS 6 小時後，可誘發血清肝功能指標 GOT (Glutamic-oxalacetate transaminase)、GPT (Glutamic-pyruvic transaminase)生化值的升高，肝組織 GSH 的減少，NO 的大量生成，誘發性一氧化氮合成酶 (iNOS) 的活性及蛋白的表現量增加，轉錄因子 NF κ B 的活化及肝組織之病變，然對膜的脂質過氧化及抗氧化酵素 GSH peroxidase 則無意義之影響；而預先口服 5 天 75 mg/kg 的原兒茶酸則能有效抑制 LPS 所誘發的肝毒性，其機制與抑制內生性 NO 之產生有關。

英文摘要

Phenolic compounds--protocatechuic acid (PCA) and anthocyanins (HS-As), containing in *Hibiscus sabdariffa* L (Malvaceae) one of Chinese traditional herbs and a beverage material in local region (Taiwan), were prepared for assessing protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced hepatotoxicity. In survival rate assay, pretreatment 75 mg/kg HS-As show minor protective effects than PCA on high dose (10 mg/kg) treatment of LPS. Furthermore, we found that LPS (5mg/kg, i.p. for 6 hrs) significantly increased the serum hepatic enzyme markers (GOT and GPT) and serum total nitrite in rats. In addition, LPS significantly decreased GSH (glutathione), activated iNOS (inducible nitric oxide synthase) activity and NF κ B of liver and enhanced liver lesion including liver cell congestion, necrosis and cellular infiltration of inflammatory leukocyte. The group of pretreatment 75 mg/kg protocatechuic acid for five days effectively inhibit LPS-induced hepatotoxicity. So, we concluded that PCA may play an inhibitory role in endotoxin-induced liver damage by decrease the production of NO.

前言

洛神花(*Hibiscus sabdariffa* L.)過去民間用於解熱、抗高血壓及治肝病，近年來為區域性(台灣)普受歡迎之飲料，雖然有報告指其多醣成分具免疫賦活作用，而過去本研究室發現其含一簡單多酚類 (protocatechuic acid)具抗氧化活性，而其色素成分屬於花青素 (anthocyanin)亦具抗氧化活性，其他藥理及生化作用仍有待研究。

原兒茶酸(protocatechuic acid)廣布於蔬菜、水果和胡桃中，乃一結構簡單的多酚類化合物，有報告指出原兒茶酸具有很強的抗氧化能力(1)，而且本實驗室過去在洛神花(*Hibiscus sabdariffa* L.)成分及活性分析中亦發現：原兒茶酸具有清除自由基的能力，對於 t-BHP 引起的鼠肝細胞毒性具有保護作用(2)。此外本實驗室也發現原兒茶酸可抑制 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)誘發 female CD-1 mice 皮膚癌於 promotion phase(3)，而且可抑制人類血癌細胞株 HL-60 之增生(4)。另有許多研究指出原兒茶酸對於 diethylnitrosamine(DEN) 引起的肝癌(5)、4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQQ)引起的口腔癌(6)、azoxymethane 引起的結腸癌(7)、N-methyl-N-nitrosourea 引起的胃癌(8)及 N-butyl-N-(4hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 引起的膀胱癌(9)皆具有抑制作用。

近年來慢性發炎或感染被認為是癌症發生的原因之一(10)，而一氧化氮(NO)在發炎和多重步驟致癌過程中扮演重要角色(11)；NO是一種含自由基的小分子，在身體裡很容易與超氧陰離子產生對細胞具有毒性的NO衍生物(如 peroxynitrite)，或是分解成有毒的氫氧自由基(hydroxy radical; OH[·])和 nitrogen dioxide(NO₂[·])(12)，造成DNA傷害，且NO也可和 heme 及 non-heme iron 作用；1991年 Radi 等(13)指出 NO 及其衍生物(Peroxynitrite)可和蛋白質的 thio group 及 glutathione 結合形成 nitrosothios，進而誘發膜脂質過氧化；由過去報告知 NO 是血管擴張因子(14)、是神經的重要傳遞物質(15)並參與身體免疫反應，有其重要的生理功能，然 NO 及其衍生物不正常生成或大量積聚時則會侵犯胞器造成功能缺失、基因突變等傷害(16)。

Lipopolysaccharide(LPS: endotoxin)是革蘭氏陰性菌細胞壁的成份(17)，有研究指出將 LPS 注射入實驗動物體內，可誘發生物體產生一連串的病理及生理效應，例如使淋巴球變性，巨噬細胞、嗜中性球和庫氏細胞的活化，補體和血液凝固路徑的啟動(18、19)，而臨床上也發現受細菌內毒素感染的病人，可導致敗血性休克和多重器官衰竭(20)。過去 Sugino 等人研究發現，LPS 主要堆積在富含網狀內皮組織的肝、脾臟器中(21)；1982年 Nathan 等人(22)指出 LPS

可刺激巨噬細胞產生活性氧系(reactive oxygen intermediates ; ROI) , 如：單氧(singlet oxygen ; O_2)、一氧化氮(nitric oxide ; NO)、過氧化氫(hydrogen peroxide ; H_2O_2)、超氧陰離子(superoxide anion ; O_2^-)、氫氧自由基(hydroxyl radical ; OH \cdot)，而這些氧自由基被認為和生物體的氧化損傷有關，能對肝細胞造成脂質過氧化，故能使脂質過氧化物 malondialdehyde(MDA)的濃度大為增加(23)，並急速提高 alanine aminotransferase (ALT)及 aspartate aminotransferase(AST)等酵素的釋放量；除此，LPS 誘發細胞的氧化損傷還可改變細胞內 prooxidant 及 antioxidant 之間的平衡，細胞中含有許多抗氧化物質，其中最重要的 endogenous antioxidant 是 GSH，在肝臟中含量豐富(24)；其它還有 catalase、glutathione peroxidase(GP)、superoxide dismutase(SOD)等抗氧化酵素，通常這些抗氧化酵素可保護細胞免於氧自由基所造成的傷害(25)。所以，本實驗利用 LPS 誘發肝毒性，觀察內生性 NO，脂質過氧化，GSH 及酵素等變化，評估洛神花茶內多酚成份是否具有抑制內毒素所誘發之肝毒性，並探討其作用機制。

材料與方法

(一)化學試劑及使用儀器

1.化學試劑

1,1,3,3-tetramethoxypropane、phosphotungstic acid、Flanine adenodiaminase (FAD)、 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(β -NADPH)、sodium pyruvate、o-phthalaldehyde (OPT)、glutathione oxidized form、glutathione reduced form、glutathione reductase、lactate dehydrogenase(LDH)、lipopolysaccharide、antipain、protocatechuic acid、dithiothreitol、chymostatin、nitrate reductase、Tris-HCl、mercaptoethanol、leupeptin、N-1-naphthylethylenediamine、TBA(thiobarbituric acid)、L-arginine、NEM、以上皆購自美國 sigma 公司；sodium nitrite、sodium phosphate、EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)、SDS、methanol(MERCK)、sodium hydroxide、n-butanol (MERCK)、hydrogen chloride、10% formalin、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、glacial acetic acid、sodium hydroxyoxide、 NaN_3 、hydrogen peroxide(H_2O_2)、sulfanilamide、zinc sulfat (ZnSO_4)、HEPES、protein assay kit (Bio Rad)。

2.儀器

Refrigerated circulator (HOTECH, 631-D)

Handy aspirator (YAMATO, WP-15)

超導核磁共振儀 (VARION, VXR-300 MHz)(中興大學)

氣相層析質譜儀 (JEOL JMS-SX/SX 102A)(中興大學)

紅外線光譜儀 (JASCO, J-0087)

熔點測定儀 (ELECTROTHERMAL, CAT NO 1A 8101)
reaction collector (ADVANTEC, SF-2120)
Evaporator (HETO, CT 110, VR-1)
UV and Visible Spectrophotometer(HITACHI ; U2000)
Fluorescence Spectrophotometer(HITACHI ; F2000)
Homogenizer(EYRLAMAZELA Z)
Microcentrifuge(Shelton , VS 15)

(二)實驗方法

一、洛神花茶多酚成份之分析:

將洛神花茶減壓濃縮後以乙酸乙酯萃取乾燥之，得 HS-E，以
Choloform: methol 當溶劑通 silica gel column 做梯度分析則可得
HS-E1, HS-E2, 再以 IR Mass NMR 等儀器測定判斷結構,其中
HS-E2 為多酚成份-原兒茶酸(PCA); 再將剩餘之洛神花茶以酸化
之甲醇萃取，然後將萃取液加入乙醚則可得沉澱色素 HS-As，
以 cellulose TLC (solvent system 為 Butanol : Acetic acid :
H₂O=4:1:5) 分析後收集，再以分光光度計做定性分析，將 PCA
及 HS-As 乾燥後冷藏備用。

二、Xanthine oxidase 活性分析：

purine 在體內的代謝因不同的生物，其產物略有不同，在人類、
人猿、爬蟲類與鳥類中，其代謝之最終產物為尿酸 (uric acid)，

Xanthine oxidase 活性之分析主要是根據 Robak 等人(1988) 之方法 (26), 藉由測定 xanthine oxidase 之產物: uric acid 的產量來看此 enzyme 的活性。其步驟如下:

1. 歸零:

將兩個 cuvettes 分別加入下列物質:

(1) 12 μ l phosphate buffer (內含 0.2 M NaH_2PO_4 、 H_2O : 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4=10:1$)

(2) 100 μ l DMSO

(3) 888 μ l xanthine buffer (phosphate buffer 內含 2×10^{-4} M xanthine)

分別放入 spectrophotometer 之 reference 與 Sample 槽中加以歸零。

2. 在測試 sample 之前, 先做控制組試驗:

分別加入下列物質於兩個 cuvettes 中

Reference cuvette:

(1) 12 μ l phosphate buffer

(2) 100 μ l DMSO

(3) 888 μ l xanthine buffer

Sample cuvette:

(1) 12 μ l xanthine oxidase (1.3 units/mg protein)

(2) 100 μ l DMSO

(3) 888 μ l xanthine buffer

混合均勻之後於室溫中靜置 10 min，測定 295 nm 並且記錄其最大之 OD 值。

3. Sample 之測試：

將兩個 cuvettes 分別加入下列物質：

reference cuvette：

(1) 12 μ l phosphate buffer

(2) 100 μ l test sample (溶於 DMSO 中)

(3) 888 μ l xanthine buffer

Sample cuvette：

(1) 12 μ l xanthine oxidase

(2) 100 μ l test sample

(3) 888 μ l xanthine buffer

混合均勻之後於室溫中靜置 10 min，測定 295 nm 並且記錄其最大之 OD 值。

三. 自由基捕捉測定:(Determination of free radical-quenching capacity)

本研究使用 DPPH (1,1-diphenyl-1-2-picrylhydrazyl radical)，藉由

DPPH來檢測洛神花茶之粗萃取物對自由基是否有捕捉的作用
(27)。

四、動物來源

Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)購自台中榮民總醫院，實驗前至少飼養於動物房一週，使其適應環境；在動物房中，以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用，並維持在日夜 12 小時循環中。

五、LPS(lipopolysaccharide)誘發 NO (nitric oxide)及肝毒性之預試驗

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)分成 4 組:除控制組外有以 LPS i.p.10 mg/kg, 5mg/kg, 2 mg/kg 三組，LPS 注射後 6 小時，將老鼠斷頸，取其血液測定 total nitrite and GOT (Glutamic-oxalacetate transaminase), GPT (Glutamic-pyruvic transaminase)。

六、多酚成份對 LPS 誘發 NO 及肝毒性之影響

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)分成 6 組，每組 10 隻，其中 Group 1 為 normal 組，僅給予蒸餾水；Group 2 為溶劑控制組，僅給予 1% DMSO 溶液；Group 3 則僅給予 PCA(75mg/kg)，Group 4 則僅給予 HS-As (75mg/kg)，以上各組以胃管連續灌食五天，每次 2ml；Group 5 以 i.p.注射 LPS (10 mg/kg)；Group 6 及 Group 7 則以胃管連續灌食 25mg/kg 和 75mg/kg 的 PCA 五天，又 Group 8 及 Group 9 則以胃管連續灌食 25mg/kg 和 75mg/kg 的 HS-As (洛神花色素粗萃物)五天，第五天灌食後，隔一小時以 i.p.注射 LPS (10mg/kg)；LPS 注射後 6 小時，將老鼠斷頸，取其血液及肝臟。

七、原兒茶酸對 LPS 誘發 NO 及肝毒性之影響

將 Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠(230±20g)分成 6 組，每組 10 隻，其中 Group 1 為 normal 組，僅給予蒸餾水；Group 2 為溶劑控制組，僅給予 1% DMSO 溶液；Group 3 則僅給予 PCA(75mg/kg)，以上三組以胃管連續灌食五天，每次 2ml；Group 4 以 i.p.注射 LPS(5mg/kg)；Group 5 及 Group 6 則以胃管連續灌食 25mg/kg 和 75mg/kg 的 PCA 五天，第五天灌食後，隔一小時以 i.p.注射 LPS(5mg/kg)；LPS 注射後 6 小時，將老鼠斷頸，取其血液及肝臟。

八、Thiobarbituric acid (TBA)method

肝細胞脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(28)，藉由 Thiobarbituric acid 來測定 malondialdehyde (MDA)的生成濃度。實驗方法：取 0.5g 肝臟，加入 3ml ice-cold 0.05M phosphate buffer(PH7.4)，然後以 polytron-like stirrer 研磨。取少部份研磨液作蛋白質定量(protein assay kit/BIO-RAD)，其餘加入 7% SDS、0.1N HCl、10% phosphotungstic acid 及 0.67% TBA 之後，避光 95°C 加熱 1 小時，冷卻後，加入 5ml n-butanol 萃取，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液測定螢光強度(Ex/Em_{515/553nm})。以 1,1,3,3-tetramethoxypropane 當作 standard。

九、Glutathione Test ---(29)

(1)組織液之製備

取 0.25g 肝細胞，加入 1ml 10% meta-phosphoric acid 及 3.75ml 0.1M Na₂HPO₄ 和 0.005M EDTA (PH8.0) 緩衝液，以 polytron-like stirrer 研磨後，經 39800 rpm 90 分鐘離心取上清液。

(2)還原態 glutathione 之測定

取 0.5ml 上清液，加入 4.5ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M Na_2HPO_4 、0.005M EDTA，PH8.0)稀釋後，取出 100 μl ，加入 0.9ml phosphate-EDTA 緩衝液與 100 μl o-phthaldehyde(1mg/ml)充份混合後，在室溫避光反應 15 分鐘，以螢光分光光度儀於 $\text{Ex}/\text{Em}_{350/420\text{nm}}$ 下測定。

(3)氧化態 glutathione 之測定

取 0.5ml 上清液，加入 0.4ml N-ethylmaleimide(NEM) (避免 GSH 氧化成 GSSG)，在室溫反應 20~30 分鐘後，取出 100 μl ，加入 0.9ml NaOH(PH12.0)與 100 μl o-phthaldehyde (1mg/ml)充份混合後，在室溫避光反應 15 分鐘，以螢光分光光度儀於 $\text{Ex}/\text{Em}_{350/420\text{nm}}$ 下測定。

十、Nitrate Test ---(30)

取 50 μl 血清加入 110 μl 100 μM NADPH、10 μM FAD 混合液及 40 μl nitrate reductase，於 37 $^\circ\text{C}$ 避光反應 30 分鐘後，再加入 20 μl 120mg/l LDH 和 20 μl 120mM pyruvate，37 $^\circ\text{C}$ 避光反應 5 分鐘後，加入 360 μl 75mg/ml ZnSO_4 充份混合後，以 2450rpm 離心 15 分鐘，取 500 μl 上清液與 500 μl Griess reagent 於室溫下反應 10 分鐘，再以分光光度計測定(波長 540nm)。

※ Griess reagent : sulfanilamide(1g/L) 和 N-1-naphthyl-ethlenediamine (0.1g/L)個別溶於 H_3PO_4 (25g/L)中。

十、Nitric Oxide Synthase activity assay

本法係參考文獻(31)修飾而得。取 0.25g 肝臟，加入 3ml 20mM Tris-HCl 及 2mM EDTA 緩衝液(PH7.8)，經均質化後，在 4 $^\circ\text{C}$ 狀態下，以 21000 \times g 離心 20 分鐘；取 25 μl 上清液作蛋白質定量，另取 50 μl 上清液加入 100 μl 50mM HEPES-2mM NADPH-10mM L-

arginine 混合液，於 37°C 水浴中避光反應 3 小時，其餘步驟同 Nitrate test。

十一、GSH Peroxidase activity assay(32)

取 0.25g 肝臟，加入 2ml phosphate-EDTA 緩衝液(0.1M potassium phosphate、0.1mM EDTA，PH=7.0)，經 polytron-like stirrer 研磨後，於 4°C 狀態下，以 39000 rpm 離心 30 分鐘，取 100 μ l 上清液加入 2.2ml 0.1M Tris-HCl(PH=7.2)、100 μ l 0.113M NaN₃、100 μ l 30mM GSH 及 100 μ l 6mM NADPH，充分混合後，再加入 50 μ l 5IU GSH-reductase，於 37°C 水浴中反應 5 分鐘，接著立刻加入 100 μ l 30mM H₂O₂，於 340nm 下掃描 3 分鐘，測定其吸光值之變化。

十二、肝組織病理切片觀察

將老鼠斷頸後，取約 2cm \times 2cm 的肝臟，置於 10% 福馬林中固定，然後作蘇木紫&伊紅(Hematoxylin&Eosin)染色，觀察肝組織有無病變。其染色步驟如下：

1. 脫臘後，以蘇木紫(hematoxylin)溶液染 2~15 分鐘。
2. 以水浸洗。
3. 以 0.5% 鹽酸溶液分辨染色色度，約 1~5 秒。
4. 浸入氫水中(1000ml 的水滴入氫水兩滴)，直至組織呈現藍色。
5. 於流水中清洗，至少須 15 分鐘。
6. 染以 0.5% 伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
7. 依次以 80%、90%、95%酒精浸洗
8. 依次移入 100%酒精、二甲苯(1:1)、二甲苯-木餾油(4:1)、二甲苯(I)、二甲苯(II)中各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明

10. 封片。

11. 以顯微鏡觀察。

十三、免疫組織化學染色

1. 將包埋在蠟中的組織切片置入已預熱至 56°C 的烘箱中脫蠟。
2. 將已加热的切片依照順序移至純的二甲苯、絕對酒精、95%酒精中各五分鐘。
3. 將切片以二次水沖洗十分鐘。
4. 將切片移至 0.05M Tris buffer [(PH7.8) 內含 0.15M NaCl 及 0.1% Triton X-100] 中五分鐘
5. 將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrate buffer，再繼續煮五分鐘。
6. 待玻片自動降溫至室溫。
7. 將玻片取出，以二次水沖洗。
8. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
9. 用 3% 的 H₂O₂ 沖洗五至十分鐘。
10. 將玻片取出，以二次水沖洗。
11. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
12. 在玻片上加入一級抗體(PY20)反應 20 至 40 分鐘。
13. 將玻片取出，以二次水沖洗。
14. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
15. 在玻片上加入二級抗體反應 30 分鐘。
16. 將玻片取出，以二次水沖洗。
17. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。
18. 在玻片上加入 biotin ligand 反應 30 分鐘。
19. 將玻片取出，以二次水沖洗。
20. 以 Tris buffer 沖洗五分鐘。

21. 加入 DAB 呈色劑在室溫下反應五分鐘。
22. 以二次水沖洗五分鐘。
23. 加入 hematoxylin 染背景，但染色時間不超過 1 分鐘。
24. 以二次水沖洗五分鐘。
25. 將已染色之玻片置於 95% 酒精中。
26. 將玻片置於絕對酒精五分鐘以脫水。
27. 將玻片滴上 xylene。
28. 以封片膠封片。
29. 顯微鏡觀察

十四、iNOS immunoblotting (33)

取 0.25g 肝臟，加入 2.7ml 20mM HEPES(PH7.4)緩衝液(內含 1mM dithiothreitol、50 μ M antipain、50 μ M leupeptin、50 μ M chy- mostatin 和 50 μ M pepstatin)，經均質化後，於 4 $^{\circ}$ C、25000 \times g 離心 30 分鐘，然後取上清液作蛋白質定量。

取約 80 μ g 蛋白質與 loading buffer(3ml distilled water、1ml 0.5M Tris-HCl(PH=6.8)、1.6ml glycerol、1.6ml 10% SDS、0.4ml β -mercaptoethanol、0.4ml 0.5% bromophenol blue)以 1:1 比例混合，於 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，然後放入冰浴中冷卻，再以小型離心機 spin down。接著將 sample 放入 well 內，以上層膠 70V，下層膠 120V 跑電泳；待電泳結束後，進行 transfer 以 nitrocellulose membrane 轉印，接著再以含 5% 脫脂奶粉的 TBS buffer(10mM Tris、150mM NaCl、0.05% Tween-20, PH8.0) blocking 30 分鐘，wash 乾淨後，將 NC paper 置於 1 級抗體中反應 overnight(4 $^{\circ}$ C)，之後以含 tween-20 之 TBS 洗三次，再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody 反應 40~60 分鐘，再以含 tween-20 之 TBS 洗三次，最後加入 Amersham ECL reagents kit 反應，於暗房以 Kodak film 曝光 1~10 分鐘，以顯

影劑及定影劑沖片觀察。

十五. Nuclear extraction (34)

1. 取 0.25g 肝臟加入 1ml PBS(PH7.4)
2. 以 polytron-like stirrer 研磨
3. 1500x g 離心 5 分鐘
4. pellet 加入 500 μ l ice-cold lysis buffer(10mM HEPES, PH7.9 ; 10mM KCl ; 0.1mM EDTA ; 0.1mM EGTA ; 1mM DTT ; 0.5mM PMSF ; proteinase inhibitor : 2 μ g/ml leupeptin 、 2 μ g/ml apoptinin 、 0.03mM sodium orthovanadate)
5. 置於冰上作用 15 分鐘
6. 加入 10% NP-40 , 劇烈震盪 10 秒鐘
7. 10000 rpm 離心 10 分鐘
8. 取 supernatants \rightarrow cytosol
9. pellet 加入 ice-cold nuclear extraction buffer(20mM HEPES PH7.9 ; 400mM NaCl ; 0.1mM EDTA ; 0.1mM EGTA ; 1mM DTT ; 1mM PMSF ; proteinase inhibitor : 2 μ g/ml leupeptin 、 2 μ g/ml apoptinin 、 0.03mM sodium orthovanadate)
10. 置於冰上作用 30 分鐘(隨時拿起來搖晃)
11. 12000x g 離心 15 分鐘
12. supernatant \rightarrow nuclear extracts

結果

一、洛神花茶成份之分析:

HS-E1 之純化與確認:

HS-E1 係以絕對酒精 (99.8%) 再結晶而得;

顏色為鮮黃色;

熔點為 65-68 °C ;

產率約為 0.1%

以下為 HS-E1 之光譜資料:

a. 紅外光譜 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: (Fig. 1)

3400 (COOH)

1750 (C=O)

900-675 (Aromatic)

b. 質譜 (m/z): (Fig. 2)

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$; M.W = 222

EI-MS (m/z) 主要斷裂訊號有:

259 (+ Cl), 223 [M+1]⁺, 192, 152

c. 核磁共振譜 (CDCl_3): (Fig. 4)

$^1\text{H-NMR}$: δ (ppm)

10.527 (COOH)

7.992

7.985 } (1H, d, J=2.1 Hz, 5-H)

7.490

7.482

7.460	
7.453	— (2H, d, d J=2.1, 8.7 Hz, 7-H)
7.144	┌
7.115	— (1H, d, J=8.7 Hz, 8-H)
4.468	┌
4.445	┌
4.441	┌
4.420	— (1H, d, d J=8.1 Hz, 3-H)
3.788	(1H, OCH ₃)
3.344	┌
3.323	┌
3.323	┌
3.198	— (2H, m, 2-H)

又苯環上H相對位置之coupling constant如下：

$$J_{\text{ortho}} \cong 7-9 \text{ Hz}$$

$$J_{\text{para}} \cong 0-0.6 \text{ Hz}$$

$$J_{\text{meta}} \cong 1-3 \text{ Hz}$$

故 3 個芳香環上 H 之位置如圖示。

¹³C-NMR: δ (ppm) (Fig. 4)

169.153	┌
169.135	— (C=O)
154.431	┌
138.791	┌
133.406	┌
128.199	┌
125.511	┌
120.295	— (Aromatic)
56.723	(OCH)
53.118	(OCH ₃)
39.499	(OCH ₂)

DEPT: (Fig. 4)

4°C	3°C	2°C	1°C
154.431	56.723	39.499	53.118
128.199	120.295		
133.406	125.511		
169.153	135.791		
169.135			

由上述之圖譜資料 (IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 與 2D 圖譜(Fig.5) 判定 HS-E1 可能為 3-methoxy-6-carboxy-4H-1benzopyran-4-one (Fig.6), 非多酚化合物。

HS-E2 之純化與確認：

HS-E2 係以絕對酒精 (99.8%) 再結晶而得；

顏色為灰白半透明結晶；

熔點為 200 °C ；

產率約為 0.1%

以下為 HS-E2 之光譜資料：

- a. 紅外光譜 $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: (Fig. 7)
- 1625-1575 (Ar-C)
 - 3400 (COOH, broad)
 - 1760 (Ar-COOH)
 - 1900 (Aromatic)
 - 750-790
 - 800-860 (Aromatic-assym-tri-)
 - 860-900

- b. 質譜 (m/z): (Fig. 8)

$C_7H_6O_4$; M.W = 154.12

EI-MS (m/z) 主要斷裂訊號有;

154、137 (M-OH)、109 (M-COOH)

c. 核磁共振譜 (CD_3OD): (Fig. 9)

1H -NMR: δ (ppm)

7.441	}	(2H, Aromatic H-, 2-H, 6-H)
7.416		
7.409		
6.814	}	(1H, d,d, 5-H)
6.811		
6.789		
6.786		

^{13}C -NMR: δ (ppm) (Fig. 10)

DEPT (Fig. 32)

170.518	(C=O)
151.532	}
146.085	
123.9301	
123.315	
117.761	
115.794	(Aromatic-C)

由上述之圖譜資料 (IR、MS、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR) 與 TLC 之 Rf 值及其顏色顯示, 判定 HS-E2 為 protocatechuic acid (3, 4-Dihydroxy-benzoic acid) (Fig.11)。

而 HS-As 由 cellulose TLC 及分光光度計與文獻比較得知其為 anthocyanin poly-phenolic components: delphinidine glycoside and cyanidine glycoside (Fig.12) 亦為多酚成份。

二、洛神花茶粗萃物之體外抗氧化分析

Table. 1 所示，洛神花茶之粗萃取物EtOAC extract (HS-E) 與色素沉澱物(HS-As) 隨著濃度增加，可使 uric acid 之吸光度降低，即表示可以抑制 xanthine oxidase 之活性，使 uric acid 之產量降低所致。另外以測試成分之濃度作為 X 軸，以抑制 xanthine oxidase 活性之百分比為 Y 軸作圖，可以求出 IC_{50} ，HS-E 為1.18. mg/ml，HS-As 為 2.21 mg/ml，因此抑制 xanthine oxidase 之活性HS-E > HS-As。

在自由基的捕捉測定實驗中，由於 DPPH 在結構上的穩定性，故可當成一指標來檢測洛神花茶粗萃取物對自由基的影響。由Table. 2，HS-E和HS-As皆可顯著的使吸光度下降，即使DPPH的量降低，而且都有dose dependent 的現象。另外分別以測試成分之濃度作為 X 軸，以捕捉自由基之百分比為 Y 軸作圖，HS-E 之 IC_{50} 為17.28 ug/ml，HS-As 之 IC_{50} 為196.84 ug/ml，所以捕捉自由基之強度HS-E > HS-As。

三、LPS 對大白鼠誘發 NO 及肝毒性之分析

由 Table 3 得知以內毒素(LPS) 2 mg/kg 以上處理 6h 即可誘發內生性 NO 的產生，因其半衰期短大多轉化為 nitrite 及 nitrate 可於血清中測得；但血清中肝毒性指標 GOT GPT (Table 4)卻於 LPS 5 mg/kg 以上才有明顯提升，因此以下以 5 mg/kg LPS 以上來進行實驗。

四、洛神花茶多酚成份對 LPS 誘發大白鼠存活率之影響:

由預試驗中我們發現(Table 5)單獨處理高劑量內毒素(10 mg/kg)老鼠有 50%存活率，當以原兒茶酸前處理再予內毒素則有 70-80% 存活率，而處理洛神花花青素則有 50-60% 存活率，因此以下實驗以原兒茶酸為材料，以 5mg/kg LPS 誘發肝毒性進行更進一步探討。

五、原兒茶酸(PCA)對於 lipopolysaccharide(LPS)所誘發之 NO_x 及肝毒性的影響及其抑制作用機制之探討

1. 原兒茶酸(PCA)對於 lipopolysaccharide(LPS)所誘發之肝毒性的影響:

如圖 13 所示，原兒茶酸能顯著的抑制由 lipopolysaccharide 所誘導鼠肝細胞滲漏之 GOT 和 GPT 生化值的升高，當以 75mg/kg 的原兒茶酸前處理時，分別降低 GOT 約 50% ($P < 0.05$)、GPT 約 80% ($P < 0.05$)。

2. 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 所誘發之脂質過氧化的影響:

以 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Table 6 所示，發現以 LPS (5mg/kg)處理 6 小時，鼠肝組織 MDA 濃度並未增加(和控制組比較)，而以原兒茶酸處理後，MDA 濃度亦無顯著改變。

3. 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 誘發肝組織 GSH/GSSG 變化之影響:

如 Table 7 所示，LPS 會減少肝組織中還原態 glutathione 的含量。由 Table 8 知 LPS 可代償性微微提高 GSH peroxidase 的活性，而預處理原兒茶酸並無明顯改變 GSH peroxidase 的活性，顯示 LPS (5mg/kg)處理 6 小時所誘發之細胞傷害與細胞內氧化/還原狀態之平衡與否有關，而若以原兒茶酸前處理，則可提高還原態 glutathione 的值。

4. 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 所誘發之 nitric oxide 的抑制作用:

LPS 可活 NO synthase 促 L-arginine 合成 NO，而 NO 非常不穩定很快就代謝成 nitrite 和 nitrate(34)，如圖 14 所示，LPS 可刺激內生性 NO 血中產物指標 total nitrite 顯著增加，而以原兒茶酸前處理之老鼠，可有效抑制之，並具有劑量依存性的關係。

5. 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 所誘發之 nitric oxide synthase activity 的抑制作用:

由圖 15 知 LPS 可刺激 nitric oxide synthase 的活性增加，但若以原兒茶酸前處理，則有效抑制 nitric oxide synthase 的活性，並具有劑量依存性的關係。

6. 原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 所誘發之 nitric oxide synthase 蛋白表現的抑制作用:

由圖 16 知 LPS 可刺激 nitric oxide synthase 蛋白表現量增加，而以低濃度(25mg/kg)原兒茶酸前處理，可抑制 nitric oxide synthase 的蛋白表現量，若以高濃度(75mg/kg)原兒茶酸前處理，則完全抑制 nitric oxide synthase 的蛋白表現。

7. 原兒茶酸對 lipopolysaccharide 活化 NF κ B 的抑制作用。

有研究指出 LPS 誘發活性氧系(ROI)的產生所導致細胞之氧化損傷，會促使轉譯因子 NF κ B 活化(35, 36)，因此以 immunoblotting 偵測 NF κ B 是否轉移至核，由圖 17 知 LPS 可刺激 NF κ B 活化(轉移至核)，而以原兒茶酸前處理之老鼠，可有效抑制 NF κ B 的活化。

8. 利用病理切片觀察原兒茶酸對於 lipopolysaccharide 所誘發之肝組織病變的抑制作用:

由圖 18 之病理切片發現單獨以 LPS 處理老鼠，可看到肝組織有充血、壞死、多型核白血球浸潤及細胞排列不規則等現象，

但若以高濃度(75mg/kg)原兒茶酸前處理，則可有效抑制。

9. 利用免疫組織化學染色法觀察原兒茶酸對 lipopolysaccharide 所誘發之 tyrosine phosphorylation 的抑制作用：

之前有研究指出，protein tyrosine kinase inhibitor 可抑制 LPS 所誘發 NO 的大量生成及 iNOS mRNA 的表現(37, 38)，故以免疫組織化學染色觀察 PY-20 的表現。由圖 19 知，LPS 可刺激 tyrosine phosphorylation 的表現(呈棕色部份)，而以高濃度原兒茶酸前處理，則可抑制其表現。

討論

由洛神花茶之成份分析中，我們發現主要有兩大類多酚化合物，一為多酚酸衍生物，一為花青素衍生物 (HS-As)，花青素衍生物佔了洛神花茶粗萃物一大半量，但其抑制 xanthine oxidase 及捕捉自由基的能力皆不如 HS-E 部份，綜合言之洛神花茶是具有抗發炎抗氧化之活性，然其作用之大小仍與攝取量有關。

細菌內毒素 lipopolysaccharide(LPS)會活化肝中 inducible nitric oxide synthase 誘發大量 NO 的產生，又可引起一聯串發炎反應，進而使動物發生敗血性休克和多重器官的衰竭，導致生物體死亡(20)，本研究發現高劑量 LPS (10mg/kg)在處理 6 小時內即可使一半老鼠死亡，而實驗中任一劑量血中 NO 指標(total nitrite)在 6 小時即上升，但肝毒性指標(GOT, GPT)則需較高劑量(>5 mg/kg)方能誘導出。

在存活率試驗中：高劑量 LPS (10mg/kg)處理 6 小時即可使一半老鼠死亡，而以原兒茶酸前處理之老鼠可增加其存活率(Table 5)；花青素衍生物 (HS-As)則效果較不明顯，可能須提高劑量。

根據過去報告(23) LPS 可造成肝細胞的脂質過氧化，使脂質過氧化物 MDA 的濃度大量增加，亦有研究指出 LPS 引起組織的傷害不一定和脂質過氧化有關(39)，本研究由 Table 6 發現：以 LPS(5mg/kg)處理老鼠 6 小時後，取肝細胞測 MDA 濃度，和控制組比較並無有意義差異性。因此 LPS 引起組織的傷害是否與脂質過氧化有關，可能與實驗採組織的時間點有密切關係。

1982 年 Nathan 等人(22)提出 LPS 可刺激巨噬細胞產生活性氧系(reactive oxygen intermediates 如 NO, superoxide 等)，造成細胞的氧化損傷，而細胞中含有許多抗氧化物質可保護細胞免受傷害；如 Table 7 所示：LPS 可顯著抑制還原態 glutathione(GSH) (和控制組比

較，抑制約 50%， $P < 0.001$ ），但若以高濃度原兒茶酸(75mg/kg)前處理，則可使 endogenous antioxidant GSH 增加($P < 0.01$)；此外，LPS 導致 GSH 減少並無伴隨 GSSG 增加，顯示 LPS 誘發產物如 NO 可能直接和 GSH 作用；而由 Table 8 知 LPS 可代償性微微提高 GSH peroxidase 的活性，而預處理原兒茶酸並無明顯改變 GSH peroxidase 的活性，顯示 LPS(5mg/kg)處理 6 小時所誘發之細胞傷害與細胞內氧化/還原狀態之平衡與否有關，而與 GSH peroxidase 抗氧化酵素關係不大，原兒茶酸可透過維持細胞內氧化/還原狀態之平衡，減少 LPS 對組織之傷害，但其詳細機制尚待進一步探討。

近年來 NO 在發炎和感染中所扮演的角色大量被探討(11)，本篇研究發現原兒茶酸能有效抑制 LPS 所導致肝功能指標(Glutamic-oxalacetate transaminase), GPT (Glutamic-pyruvic transaminase)等酵素生化值之升高；而投予 75mg/kg 的原兒茶酸可有效抑制 LPS 所誘發 NO 的增加(~50%)，而對於 LPS 所誘發 iNOS 活性的升高和 iNOS 蛋白的表現，原兒茶酸皆能有效抑制；以上實驗顯示原兒茶酸對於 LPS 誘發肝毒性具有保護作用，且部份機制與抑制大量 NO 的生成有關。

過去有報告提到多型核嗜中性球是 LPS 導致肝組織發炎和傷害的指標，而由本實驗的病理切片觀察到以腹腔注射 LPS(5mg/kg) 6 小時後，肝組織有充血、壞死、細胞排列不規則及多型核嗜中性球浸潤等現象，而以高濃度原兒茶酸處理後可有效抑制。

根據過去研究(36)，當細胞受到 LPS 或氧化劑等刺激，會促使產生活性氧系(ROI)和導致 GSH depletion，進而活化 NF κ B translocation 至細胞核，導致下游 target gene(ex: iNOS)的活化；又有報告指出 protein tyrosine kinase inhibitor 可抑制 LPS 所誘發 NO 的大量生成及 iNOS mRNA 的表現(37)，另 Michael(39)等提到發炎的細胞會製造大量的 TNF- α ，而 TNF- α 會促使 protein tyrosine phosphorylation 進一步活化 NF κ B，因此我們進一步偵測原兒茶酸

是否影響 LPS 活化 NF κ B 及 LPS 誘發之 tyrosine phosphorylation，而由本實驗發現，以原兒茶酸前處理則能有效抑制 LPS 活化 NF κ B 及誘發 tyrosine phosphorylation，顯示原兒茶酸對於 LPS 引起的鼠肝毒性之抑制作用，與抑制發炎訊息傳遞亦有關。

總之:本計劃得知洛神花茶含有多酚成份，其具抗發炎、抗氧化等活性，而對於其一成份--原兒茶酸我們做了較深入的探討，發現其能有效抑制 LPS 所誘發的肝毒性，其機制與透過 GSH 系統維持細胞內氧化/還原平衡及抑制 NO 的產生或發炎訊息之傳遞有關。

結論與建議

本實驗擬以內毒素 LPS 誘發內生性 NO 及脂質過氧化進而誘發肝毒性，以評估洛神花茶中多酚成份是否具有保護或抑制作用。在試驗中發現 LPS 可大量誘發內生性 NO，但無法誘發脂質過氧化作用，文獻對 LPS 是否誘發組織脂質過氧化作用仍有所爭議，因根據體外試驗發現 NO 是超氧陰離子(superoxide anion)之終結者，而 LPS 會誘發多型核白血球浸潤，其含豐富之 NADPH oxidase, myeloperoxidase、xanthine oxidase 等氧化酵素，會產生很多活性氧，因此我們認為 LPS 是否誘發組織脂質過氧化作用與 LPS 之處理劑量及時間有密切關係。本研究雖對 LPS 誘發組織脂質過氧化作用之劑量及時間尚未確定，但發現 LPS 在 5mg/kg 處理 6h 後可誘發大量內生性 NO 及肝毒性，而洛神花茶多酚成份中原兒茶酸在實驗劑量下有較明顯的保護作用，其部分機制與抑制 inducible NOS activity and expression 有關。

LPS 注射入實驗動物體內，可誘發生物體產生一連串的病理及生理效應，例如使淋巴球變性，巨噬細胞、嗜中性球和庫氏細胞的活化外，補體和血液凝固路徑也會被啟動，因此在探討 PCA 對 LPS 誘發肝毒性全盤機制上較不易，將來可由細胞試驗進行各項相關機制之探討。

慢性發炎和感染被認為是癌症發生的原因之一(10)，而近年來 NO 及其衍生物如 peroxynitrite 等在多重步驟致癌過程中扮演角色備受重視，由本研究知原兒茶酸可透過抑制 inducible NOS activity and expression 抑制 NO 的合成，或許可發展為癌症預防物質，有待進一步研究。

洛神花茶花青素(HS-As)為洛神花茶中之主成份，本研究中發現其具較弱之抗氧化及抗發炎之作用，對 LPS 誘發老鼠死亡之抑制

效果亦較差，但提高劑量可能會有較明顯保護作用，而其作用機制如何？亦值得進一步研究。

LPS 能顯著降低 GSH，其可能因 LPS 可大量誘發內生性 NO 與 GSH 反應成 GSNO，與其它消耗 GSH pathway 關係不大，因 GSSG 並無相伴增加；而以原兒茶酸前處理之老鼠則可增加 GSH 的含量，由實驗得知乃因原兒茶酸可抑制內生性 NO 之形成。

綜合言之：由本實驗我們發現 (a) 洛神花茶中含有豐富之多酚成份其具抗氧化活性；(b) LPS 可誘發大量內生性 NO 及肝毒性；(c) 以原兒茶酸前處理之老鼠則可減少 LPS 所誘發大量內生性 NO 及肝毒性；(d) LPS 能顯著降低 GSH，而以原兒茶酸前處理之老鼠則可增加內生性抗氧化物質 GSH 的含量；(e) 原兒茶酸可有效抑制 LPS 所導致 iNOS 活化及蛋白的大量表現；(f) 原兒茶酸能抑制 LPS 誘發 NF κ B translocation 至細胞核及 tyrosine phosphorylation，終止 NO 的合成或相關發炎訊息之傳遞。

參考資料

1. Huang, M-T., and Ferrano, T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In : M-T. Huang, C-T. Ho, and C. Y. Lee(eds.), Phenolics Compounds in Food and Health : Antioxidants and Cancer Prevention, American Chemical Society Symposium Series 507:8-34. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1992.
2. Tsui-Hwa Tseng, Chau-Jong Wang, Erl-Shyh Kao, and Hia-Yih Chu. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Interaction*, 101 : 137-148, 1996.
3. Tsui-Hwa Tseng, Jeng-Dong Hsu, Ming-Hsiang Lo, Chia-Yih Chu, Fen-Pi Chou, Chao-Lu Huang, Chau-Jong Wang. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer letters*, 126 : 199-207, 1998.
4. Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Yoshimi N., Mori H.. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.* 53 : 2775-2779, 1993.
5. Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., Okamoto K., Mori H., Har A. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res*, 54 : 2359-2365, 1994.
6. Kawamori T., Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Ohnishi M., Mori H. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid, *Jpn. J. Cancer Res.* 54 : 2359-2365, 1994.

7. Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* 75 (6 Suppl.) : 1433-1439, 1995.
8. Hirose Y., Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., Makia H., Mori H., Satoh K., Hara A. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, 16(10) : 2337-2342, 1995.
10. Ahshima H, Bartsch H. Chronic infection and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, 305 (2) : 253-264,1994.
11. Maeda H, and Akaike T. nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammatory, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 63(7) : 854-865, 1998.
12. Beckman J. S., Beckman J., Marshall P. A., Foman B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 : 1620, 1990.
13. Stamler J. S., Simon D. I., Osborne J. A., Mullins M. E., Jaraki O., Michel T., Singel D. J., and Loscalzo, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 444-448,1992.
14. Palmer R.M.J., Ferrige A. G. and Moncada S.. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327 : 524-526, 1987.
15. Bredt D. S., Hwang P. M. and Snyder S. H.. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347 : 768-770, 1990.
16. Bittrich, H., Matik A.K., Kraker I. and Appel K.E.. NO₂-Induced DNA single strand breaks are inhibited by antioxidative vitamins in

- V79 cells. *Chemico-Biological Interaction*, 86 : 199-211, 1993.
17. Thurman R. G.. Mechanisms of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupper cells by endotoxin. *The American Physiological Society*, G605-G611, 1998.
 18. Morrison D. C., and Ryan J. L.. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* 28 : 293-450, 1979.
 19. Morrison, D. C., and Ulevitch R. J.. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* 93 : 525-617, 1978.
 20. Van Deventer, S. J. H., Buller, H. R., Cate, J. W., sturk, A., and Pauw W. Endotoxemia : An early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancets* 8586 : 605, 1988.
 21. Sugino K., Dohi K. Yamada and Kawasaki T.. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage the protective effect of antioxidants. *Surgery*, 101 : 746, 1987.
 22. Nathan C.F. Secretion of oxygen intermediates : role in effector functionsof activated macrophages. *Fed. Proc.* 41 : 2206, 1982.
 23. Yoshikawa Y., Takano H., Takahashi S., Ichikawa H. and Kondo M. . Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in endotoxin-induced mutiple organ failure. *Circ. Shock*, 42 : 53, 1994.
 24. Meister A. and Anderson M. E.. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 711, 1983.
 25. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science Wash. DC* 201 : 875-880, 1978.
 26. Robaj J. and Gryglewski R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of

- superoxide anion. *Pharmacology*, 37(5), 837-841.
27. Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A. and Pifferi G. (1994)
A novel antioxidation flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine*. 16 (5), 547-553.
 28. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem Phys Lipid*, 45 : 337-351, 1987.
 29. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem*. 27 : 502-522, 1969.
 30. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P., Wishnok J. S., and Tannenbaum S. R. *Anal. Biochem*. 126 : 131-138, 1982.
 31. Drapier J. C., Pellat C., and Henry Y. Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor targets cells cocultured with activated macrophage. *J Biol Chem*, 266(16) : 10162-10167, 1991.
 32. Paglia, D. E. and Vaentine, W.N. Studies on the qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Clin Med*. 70, 158-169, 1967.
 33. Edgar Schreiber, Patrick Matthias, Michael M.Muller and Walter Schaffner. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells. 17 : 6419, 1989.
 34. Moncada S., R. Palmer M. J., and higgs E. A.. Nitric oxide : physiology , pathophysiology , and pharmacology. *Pharmacological Review*, 43(2) : 109-142,1991.
 35. Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA. Reactive oxygen species intermediates as apparently widely used messengers in the activation

- of the NF κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10 : 2247-2258, 1991.
36. Kalus Schulze-Osthoff, marek Los and Patrick A. baeuerle. Redox signalling by transcription factors NF κ B and AP-1 in lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 50(6) : 735-741, 1995.
37. Lee B.S., Kang H.S., Pyun K.H., and Choi I. Roles of tyrosine kinases in the regulation of nitric oxide synthesis in murine liver cells : modulation of NF-kappa B activity by tyrosine kinases. *Hepatology*, 25(4) : 913-919, 1997.
38. Michael T. Anderson, frank J. Staal, Carlos Gitler, Leonard A. Herzenberg and Leonore A. Herzenberg. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 11527-1531, 1994.
39. Mercer D.W., Smith G.S., Cross J.M., Russell D.H., Chang L., and Cacippo J. Effect of lipopolysaccharide on intestinal injury: potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J. Surg. Res.* 63: 185-188.

Table. 1 Effect of crude extracts on decreasing xanthine oxidase.

Reagent	Concentration(μ g/ml)	% of inhibition ^a
HS-E	100	10.75
HS-E	200	20.00
HS-E	500	26.05
HS-As	100	1.82
HS-As	200	3.50
HS-As	500	10.92

a. % of inhibition = (OD. of control - OD. of test) / OD. of control

Table. 2 Effect of crude extracts on decreasing free radical (DPPH).

Reagent	Concentration (μ g/ml)	% of bleaching
HS-E	10	46.53
HS-E	100	60.52
HS-E	200	67.61
HS-E	500	93.78
HS-As	100	47.06
HS-As	200	50.27
HS-As	500	58.70

a. % of bleaching = (OD. of control - OD. of test) / OD of control.

Table 3. Effect of lipopolysaccharide on serum total nitrite and the survival rate of rats.

Treatment ^a	total nitrite (μM)	% of survival
Normal	27 ± 6	100 (6/6)
LPS (2 mg/kg)	182 ± 24	100 (6/6)
LPS (5mg/kg)	268 ± 82	100 (6/6)
LPS (10mg/kg)	525 ± 76	50 (3/6)

a. Rats (n=6) of each group were treated with various concentration of LPS respectively , then killed after 6 h. Blood was collected for total nitrite assay as described in the text.

Table 4. Effect of lipopolysaccharide on serum GOT and GPT of rats

Treatment ^a	GOT (IU)	GPT (IU)
Control	166 ± 12	50 ± 12
LPS (2 mg/kg)	187 ± 25	88 ± 15
LPS (5mg/kg)	524 ± 102*	408 ± 92*
LPS (10mg/kg)	1225 ± 276*	1033 ± 265*

a. Rats (n=6) of each group were treated with various concentration of LPS respectively, then killed after 6 h. Blood was collected for GOT and GPT assay as described in the text. *P<0.05, compared with control group.

Table 5. Effect of pretreatment protocatechuic acid on the survival rate of rats after administration of lipopolysaccharide.

Treatment ^a	survival rate (%) ^b
Normal(dist H ₂ O)	100 (10/10)
Control(1% DMSO)	100 (10/10)
PCA (75mg/kg) alone	100 (10/10)
HS-As (75mg/kg) alone	100 (10/10)
LPS (10 mg/kg) alone	50 (5/10)
PCA (25mg/kg) + LPS	70 (7/10)
PCA (75mg/kg) + LPS	80 (8/10)
HS-As (25mg/kg)+ LPS	50 (5/10)
HS-As (75mg/kg)+ LPS	60 (6/10)

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid or HS-As for five days. The rats were killed 6 hours after administration of bacterial lipopolysaccharide (10 mg/kg) by i.p.

^b survival rate (%) = survival number of rats / total number of rats × 100%.

Table 6. Effect of pretreatment protocatechuic acid on lipid peroxidation products (MDA) after administration of lipopolysaccharide in rats.

treatment ^a	MDA(nmole/g tissue)
Normal	25.1630±3.4306
control (1%DMSO)	24.5610±3.5042
PCA(75mg/kg) alone	27.1147±0.5763
LPS(5mg/kg) alone	23.9600±1.5119
PCA(25mg/kg)+LPS	30.5933±3.6469
PCA(75mg/kg)+LPS	26.5760±3.1125

^a Rats were treated with dist.H₂O, 1 % DMSO, 25 and 75mg/kg protocatechuic acid for five days. The animals were killed 6 hours after administration of bacterial lipopoly-saccharide (5mg/kg) and the rat livers were prepared for determination.

Table 7. Effect of pretreatment protocatechuic acid on hepatic reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) after administration of bacterial lipopolysaccharide in rats.

Treatment ^a	GSH	GSSG
	nmole/mg protein	
Normal	49.34±4.16	12.97±2.63
Control	50.22±4.66	12.07±1.68
PCA	45.48±5.06	11.70±3.60
LPS(5mg/kg)	25.50±4.86 [#]	7.66±0.81 [#]
PCA(25mg/kg)+LPS	27.20±4.56	9.97±1.53
PCA(75mg/kg)+LPS	32.45±3.17 [*]	11.35±0.93 ^{**}

^a Rats were treated with dist.H₂O, 1% DMSO, 25 and 75mg/kg protocatechuic acid. Five days later, the animals were killed 6 hours after administration of bacterial lipopolysaccharide (5mg/kg) and the rat livers were prepared for determination. [#] P < 0.001, compared with control group; ^{*} P < 0.01, ^{**} P < 0.001, compared with lipopolysaccharide alone group.

Table 8. Effect of pretreatment protocatechuic acid on hepatic GSH peroxidase activity after administration of lipopolysaccharide in rats.

Treatment ^a	GSH peroxidase(μ M/mg protein)
Normal	1.79 \pm 0.26
Control	1.88 \pm 0.22
LPS(5mg/kg)	2.61 \pm 0.58
PCA(25mg/kg)+LPS	2.23 \pm 0.24
PCA(75mg/kg)+LPS	2.29 \pm 0.13

^a Rats were treated with dist.H₂O、1% DMSO、25 and 75mg/kg protocatechuic acid. Five days later, the rats were killed 6 hours after administration of bacterial lipopolysaccharide (5mg/kg) by i.p. and the rat liver were prepared for determination.

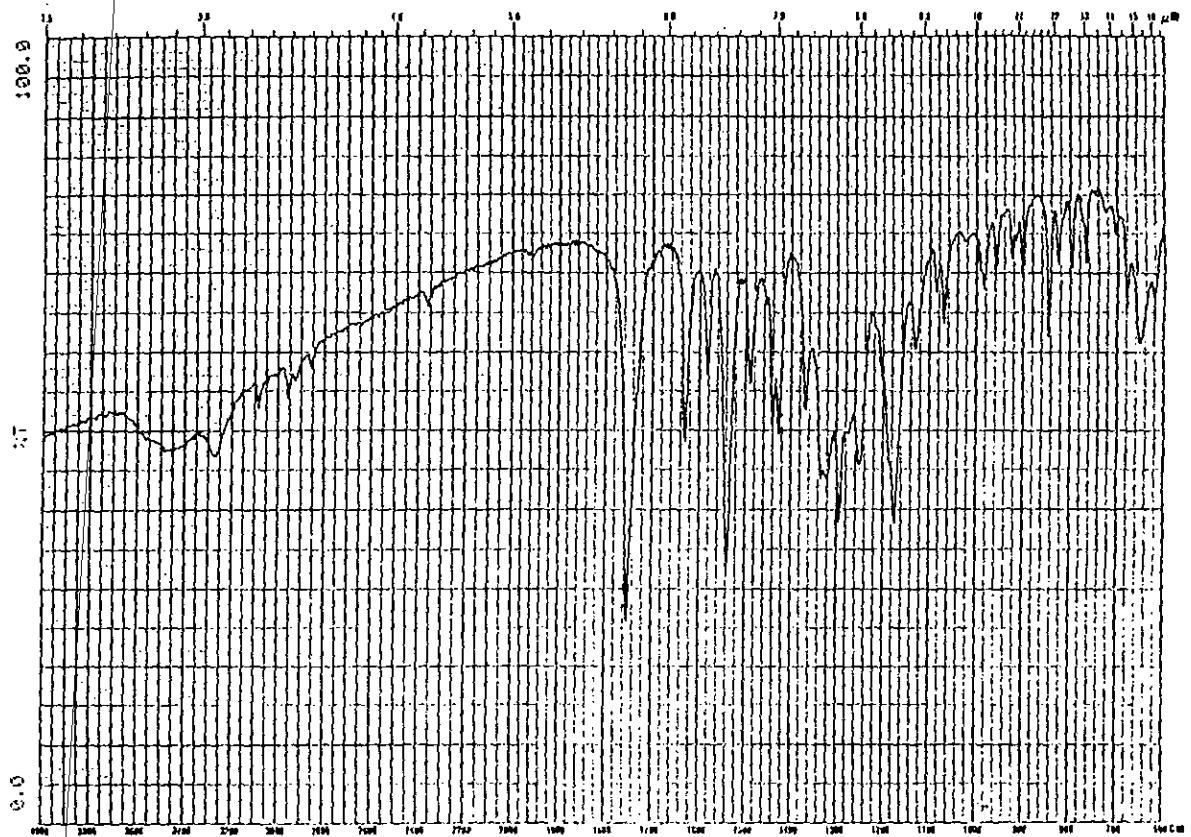


Fig.1 IR spectrum of HS-E1.

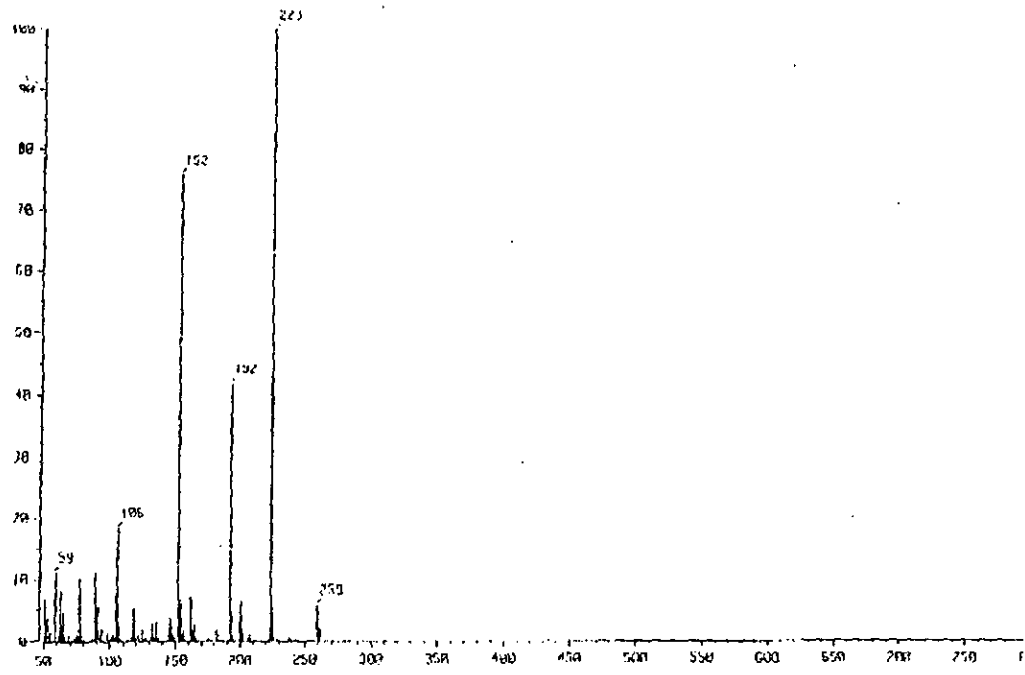


Fig.2 Mass spectrum of HS-E1.

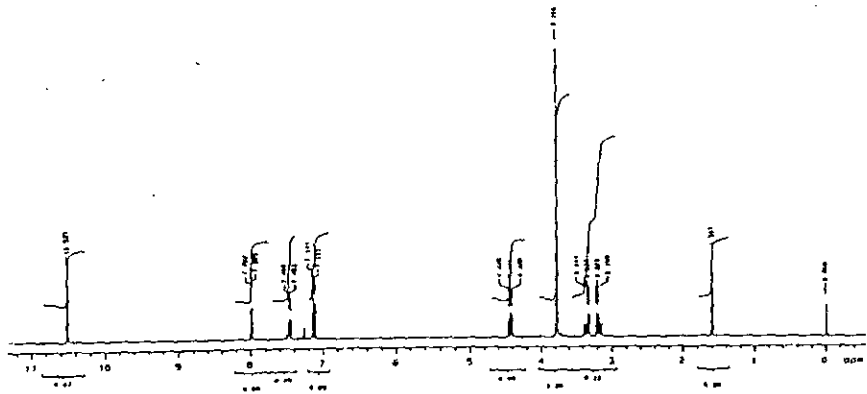


Fig.3 ¹H-NMR spectrum of HS-E1.

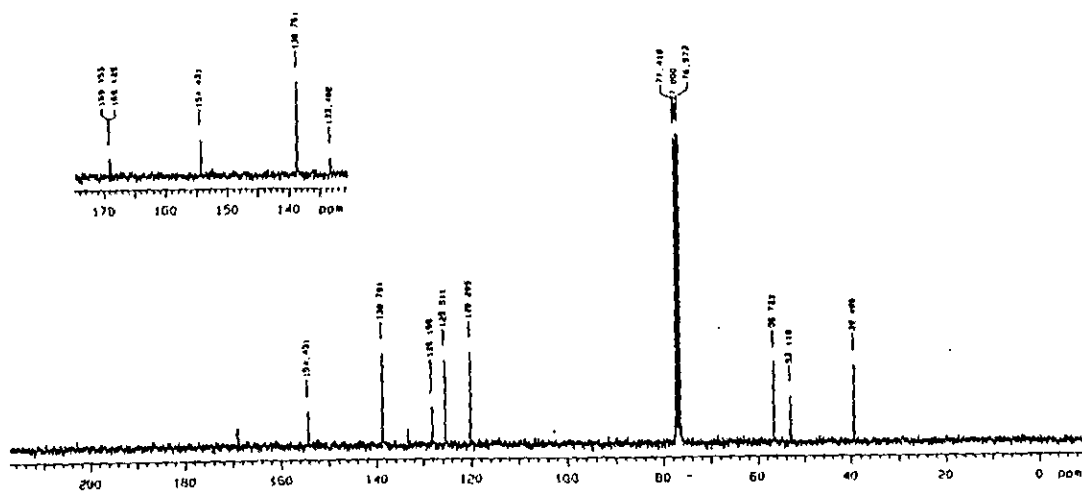
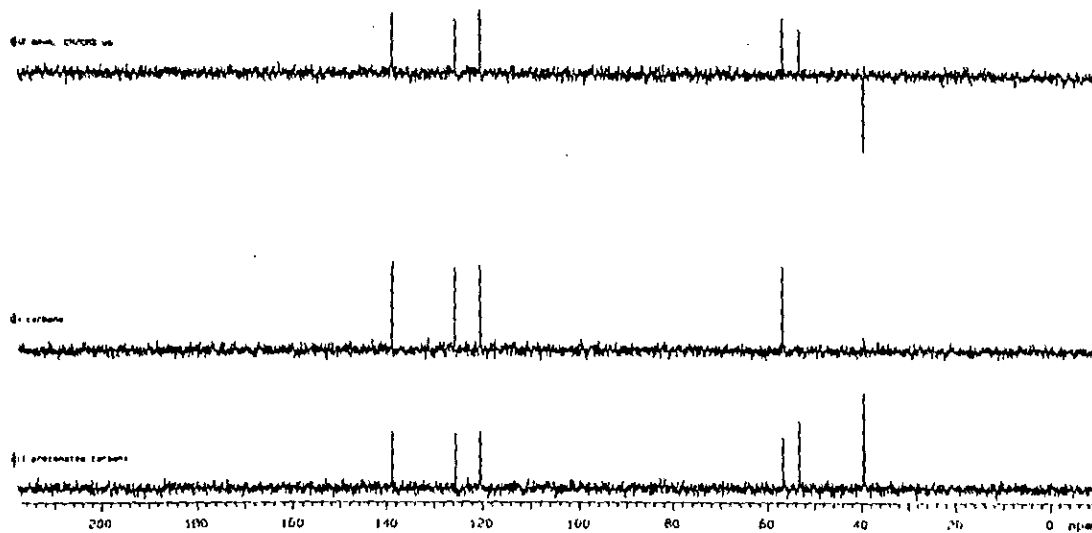


Fig.4 ¹³C-spectrum of HA-E1

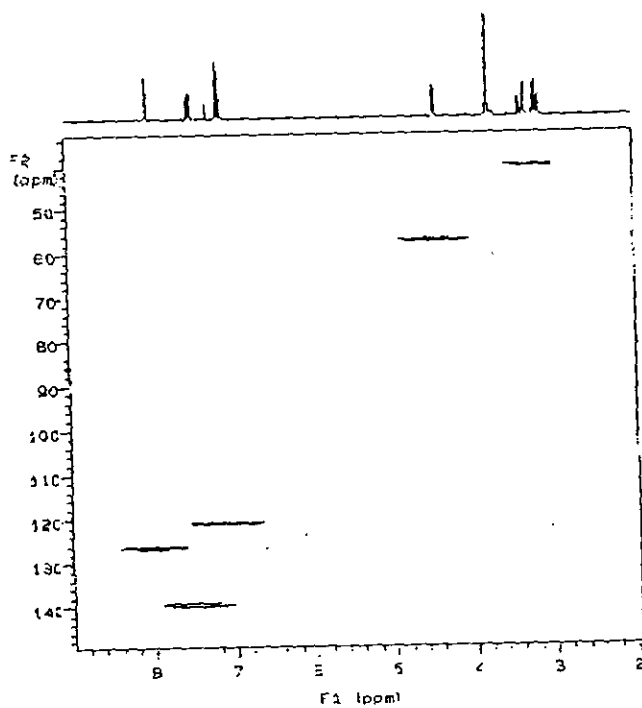
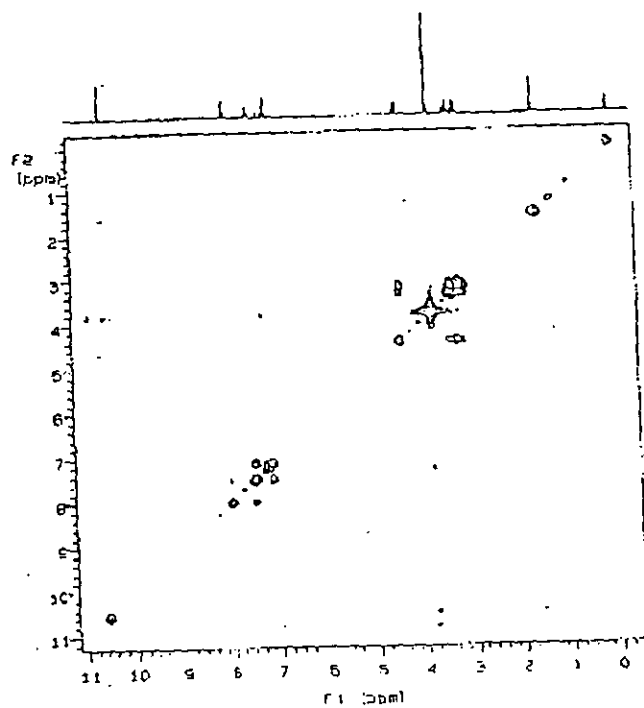


Fig.5 2D NMR spectrum of HS-E1

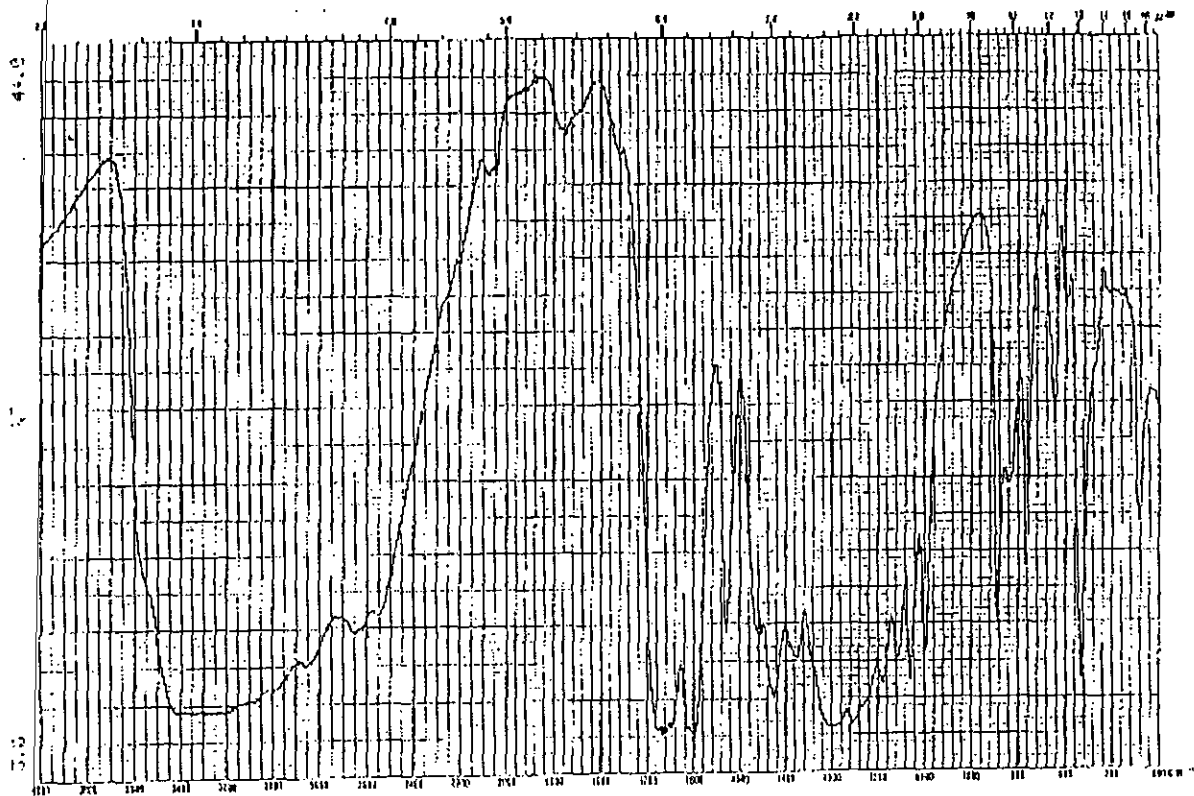


Fig.7 IR spectrum of HS-E2.

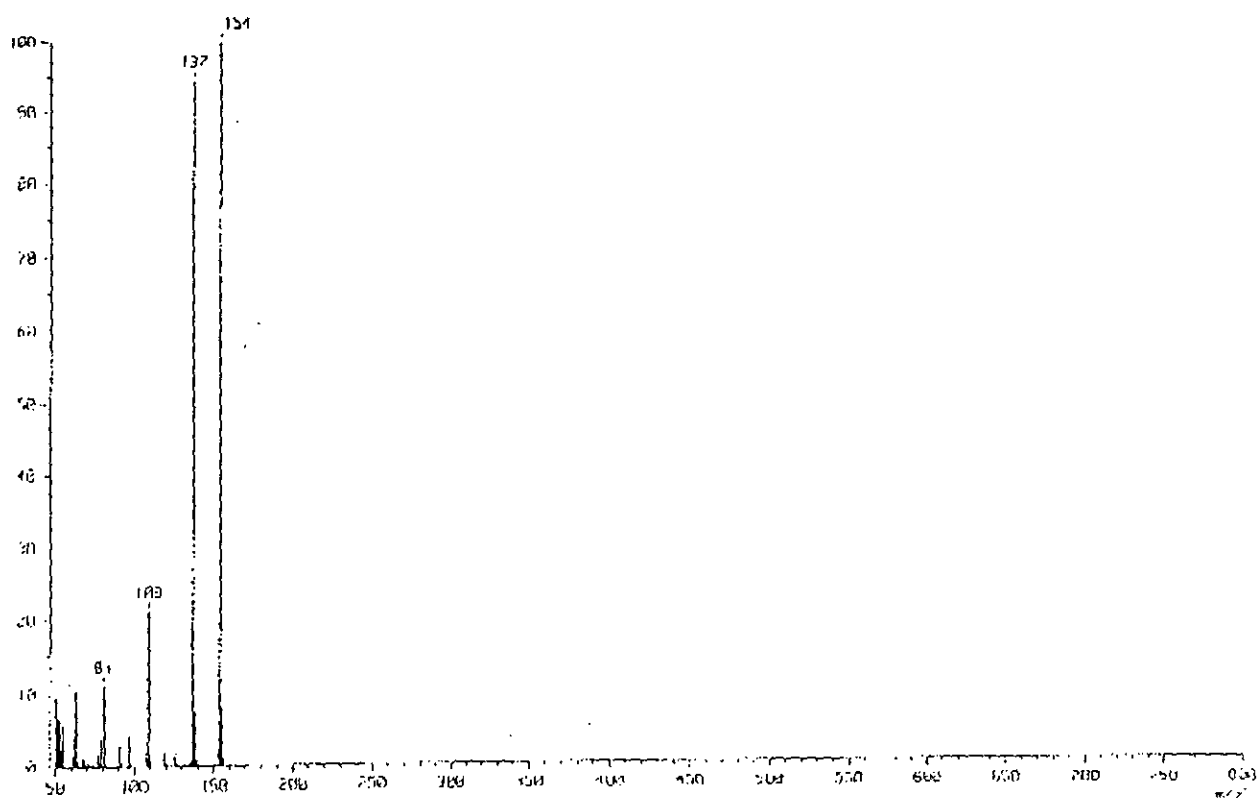


Fig.8 Mass spectrum of HS-E2.

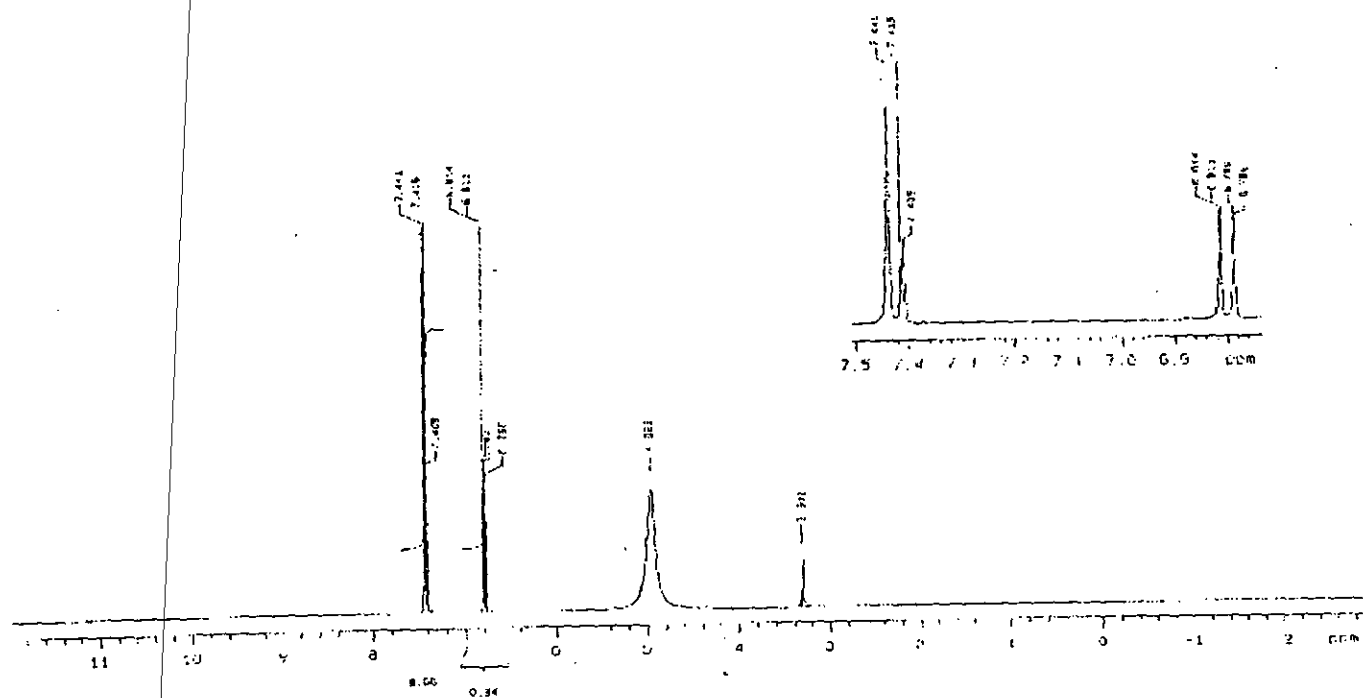


Fig.9 ¹H-NMR spectrum of HS-E2.

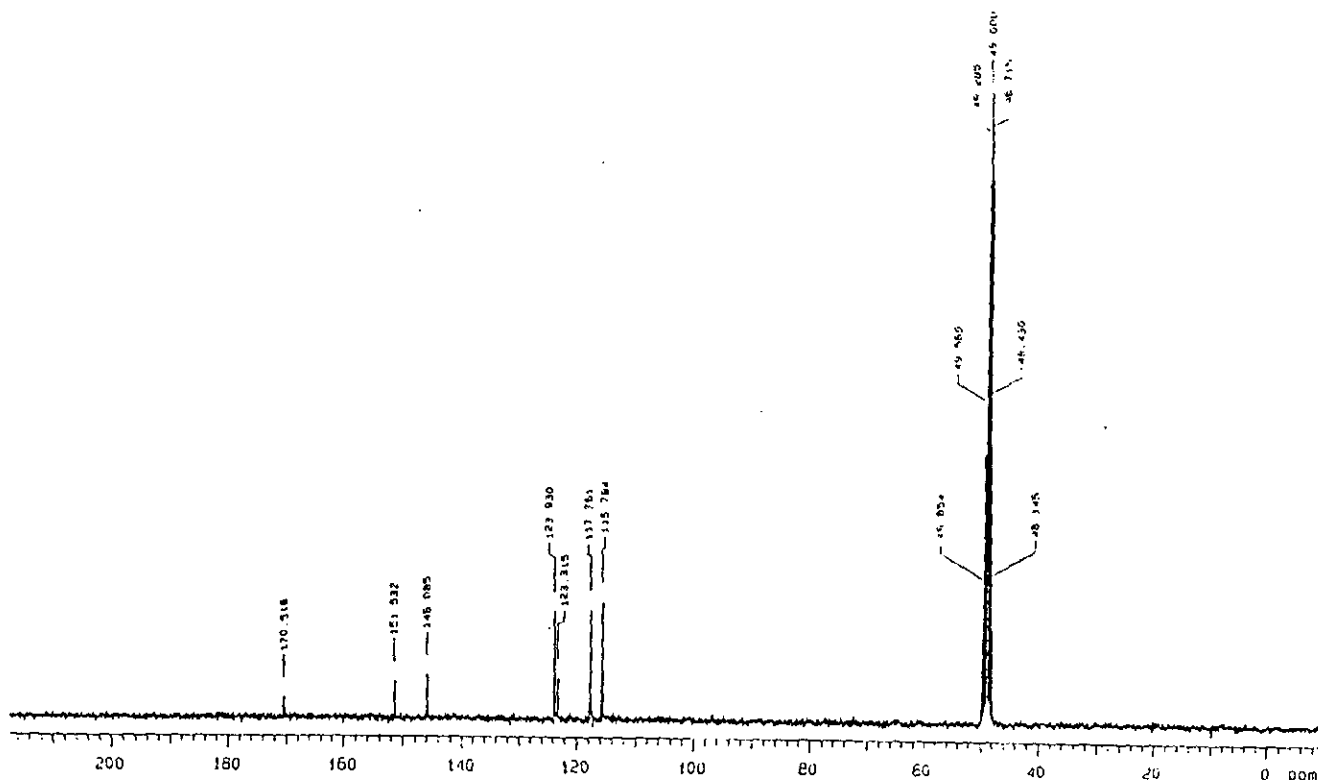


Fig.10. ^{13}C -NMR spectrum of HS-E2.

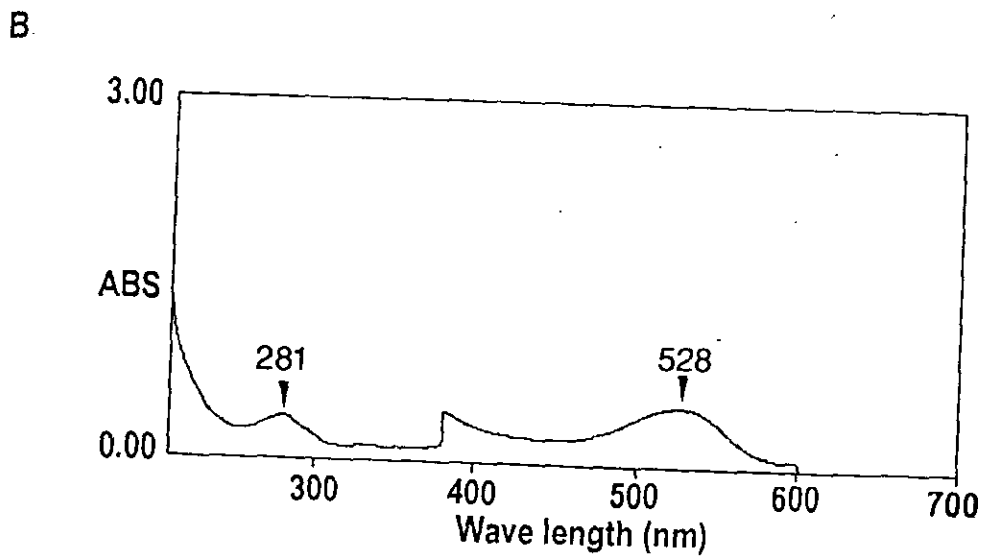
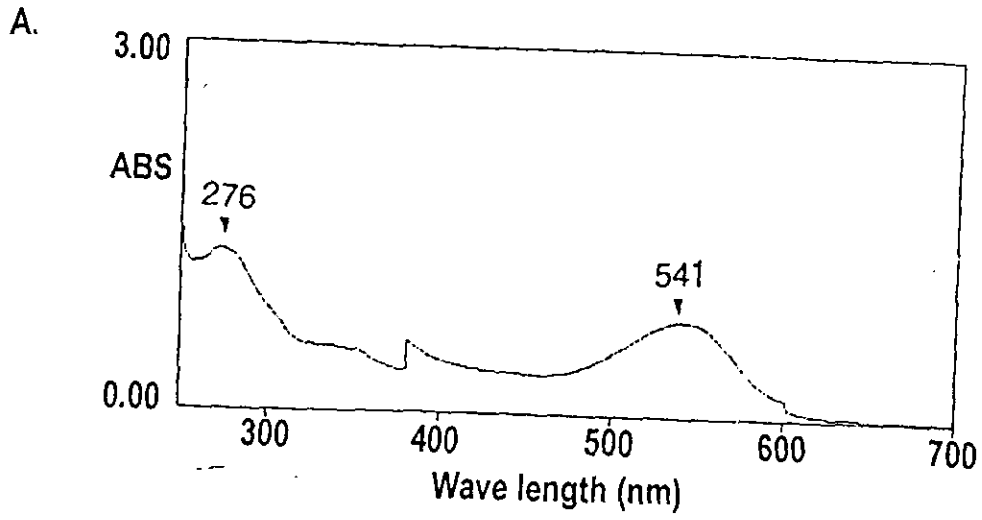


Fig.12. UV-Visible spectra of two pigments from *Hibiscus* anthocyanins (HS-As) (A) delphinidin-3-glucoside and (B) cyanidin-3-glucoside. ABS= absorbance.

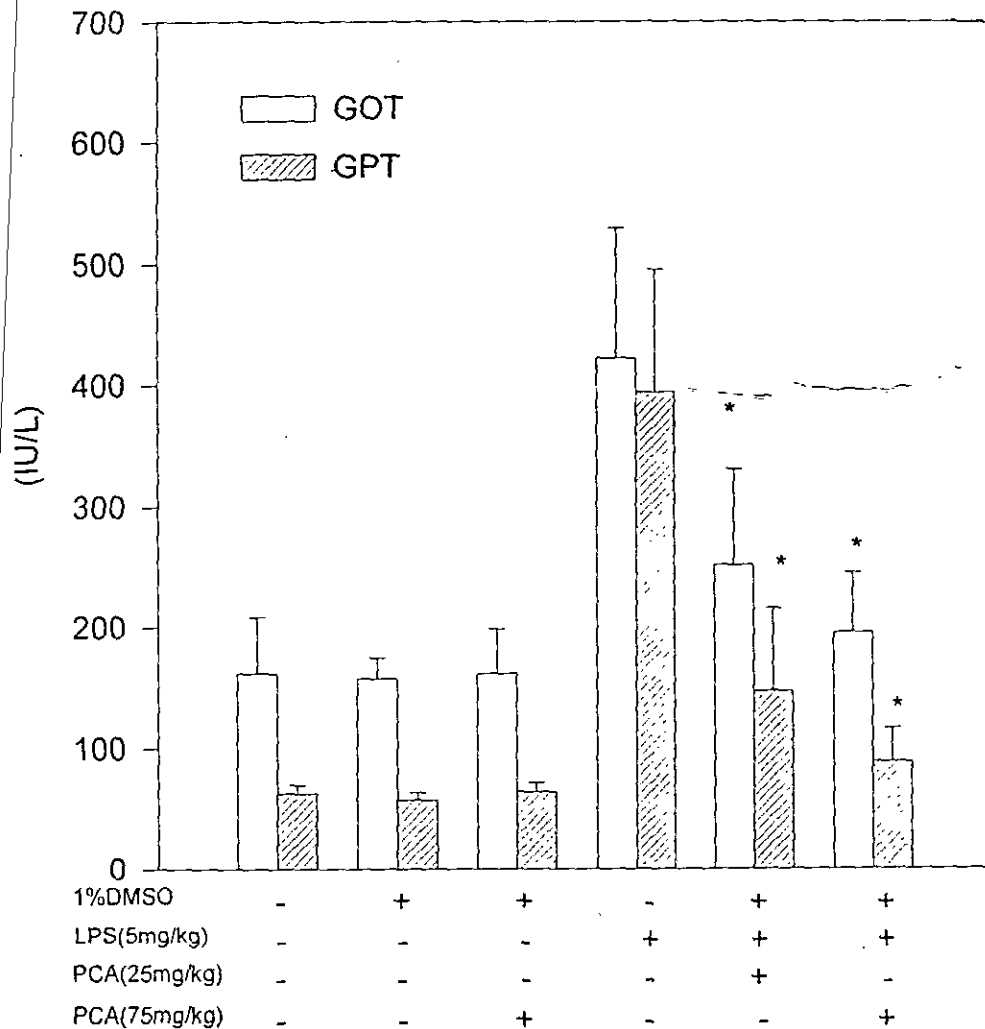


Fig.13 Effect of pretreatment protocatechuic acid on the activities of serum GOT and GPT after administration of lipopolysaccharide in rats. * $P < 0.05$, compared with lipopolysaccharide alone group (n=6).

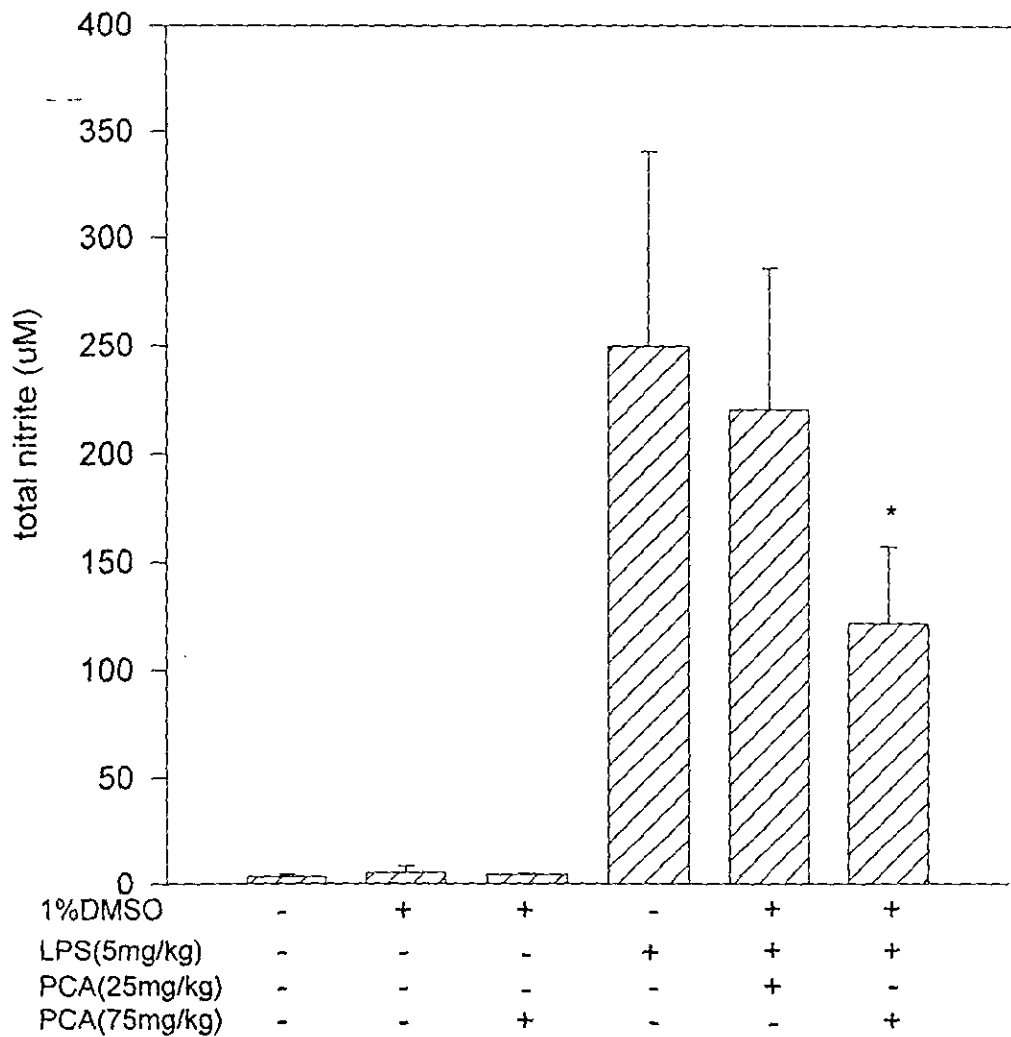


Fig.14 Effect of pretreatment protocatechuic acid on serum total nitrate after administration of lipopolysaccharide in rats. *P<0.01 , compared with normal group. **P<0.05 , compared with LPS alone group (n=6).

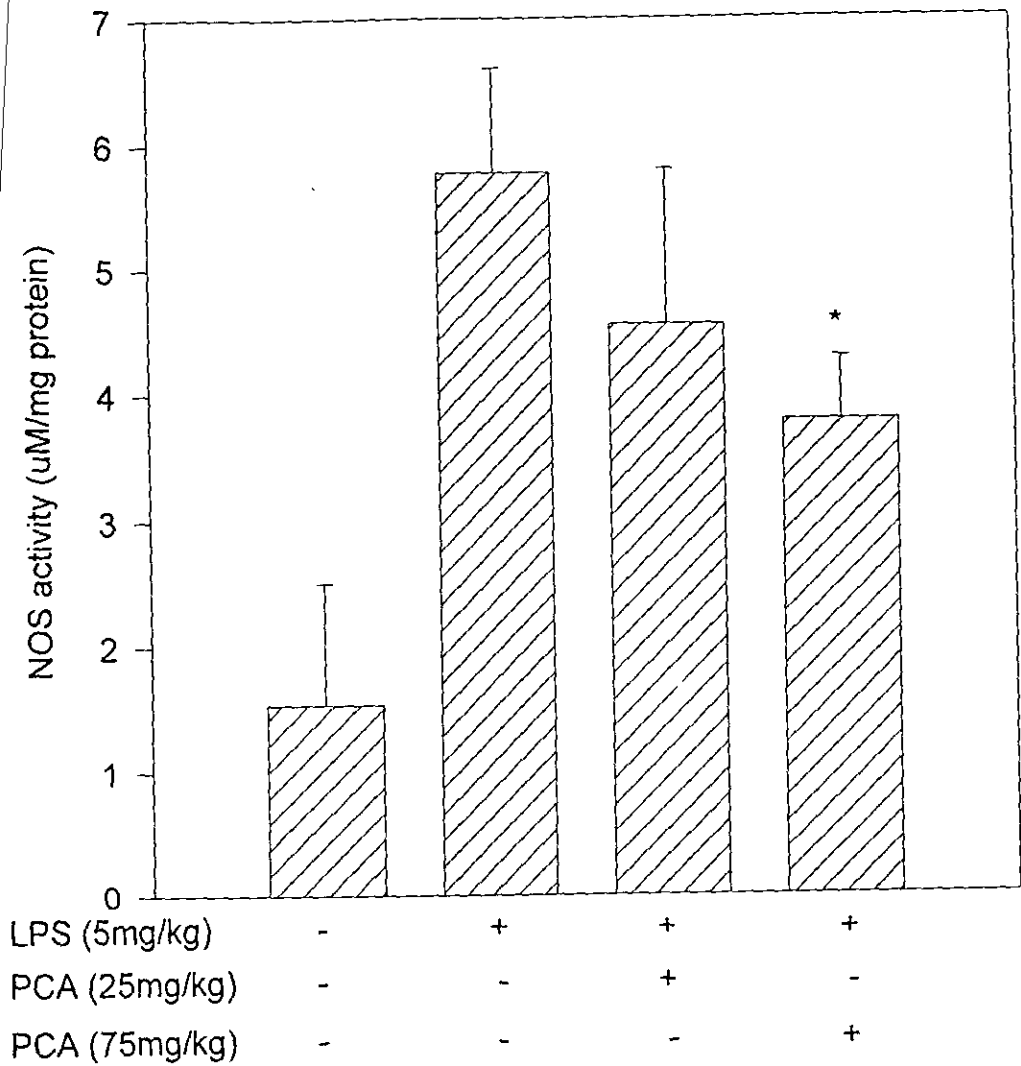


Fig.15 Effect of pretreatment protocatechuic acid on inducible nitric oxide synthase activity after administration of lipopolysaccharide in rats.* $P < 0.05$, compared with LPS alone group (n=6).

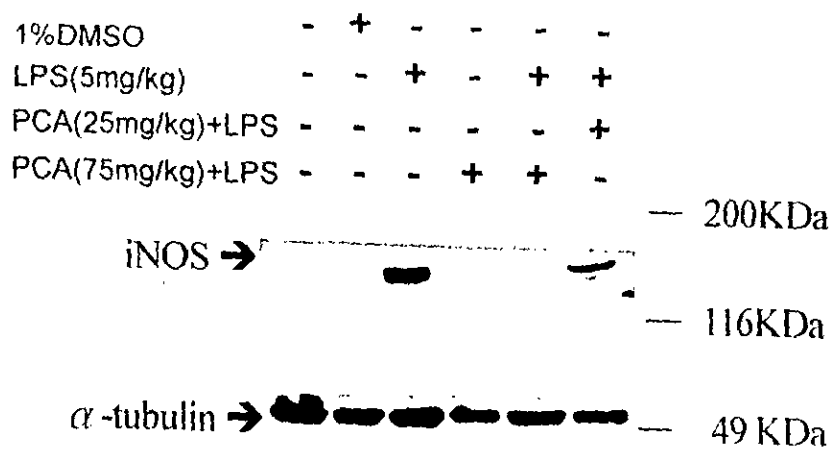


Fig.16 Effect of pretreatment protocatechuic acid on inducible nitric oxide synthase after administration of lipopolysaccharide in rats. The result is one representative data of two independent experiments.

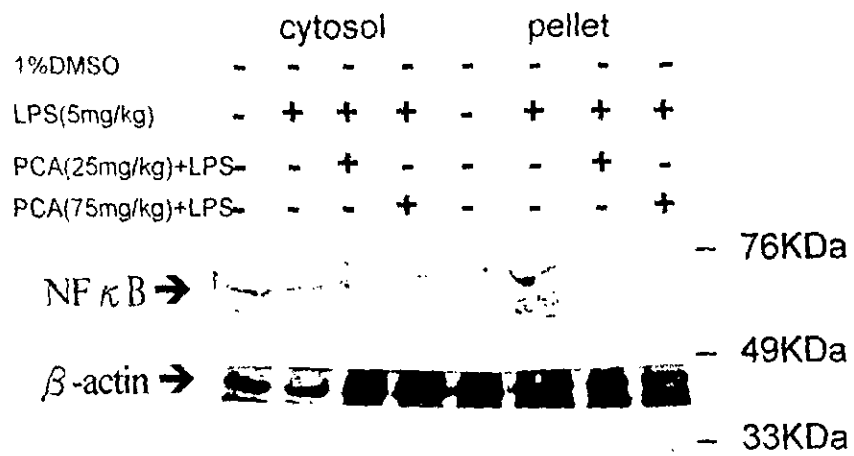


Fig.17 Effect of pretreatment protocatechuic acid on NF κ B after administration of lipopolysaccharide in rats. The result is one representative data of two independent experiments.

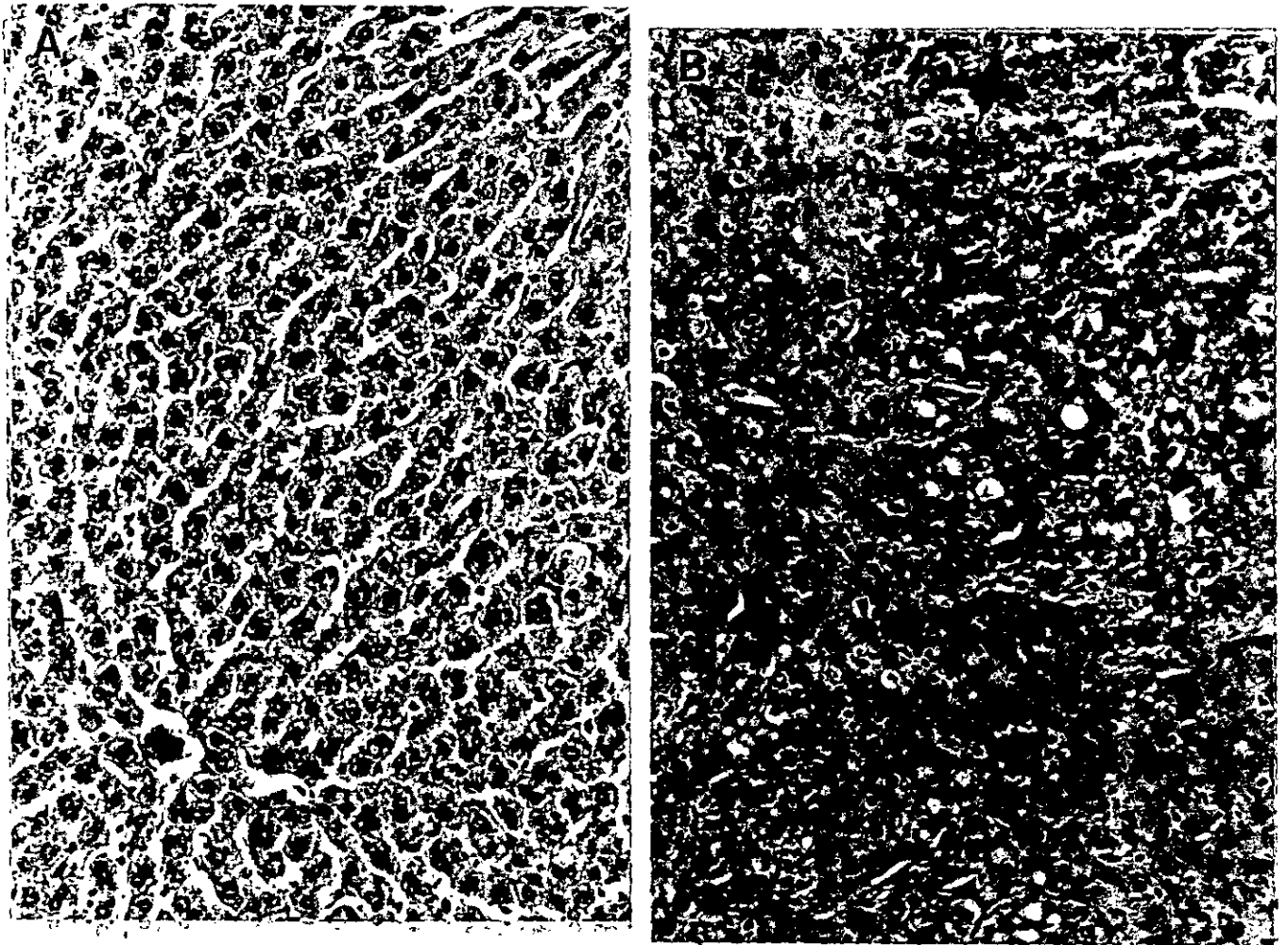


Fig.18 Effects of PCA on LPS induced liver damage. (A) Solvent control group (n=6). (B) Animals treated with LPS (5mg/kg) showed degeneration, swelling severe and neutrophil leukocyte infiltration (thin arrow), and congestion (thick arrow). (C) Animals pretreated with 25 mg/kg PCA, and then with LPS showed partially hepatocyte degeneration and swelling and infiltration of inflammatory leukocytes (thin arrow) and congestion remains. (D) Animals pretreated with 75 mg/kg PCA and then with LPS showed no pathological change ; hematoxylin/eosin staining; magnification 100 fold.

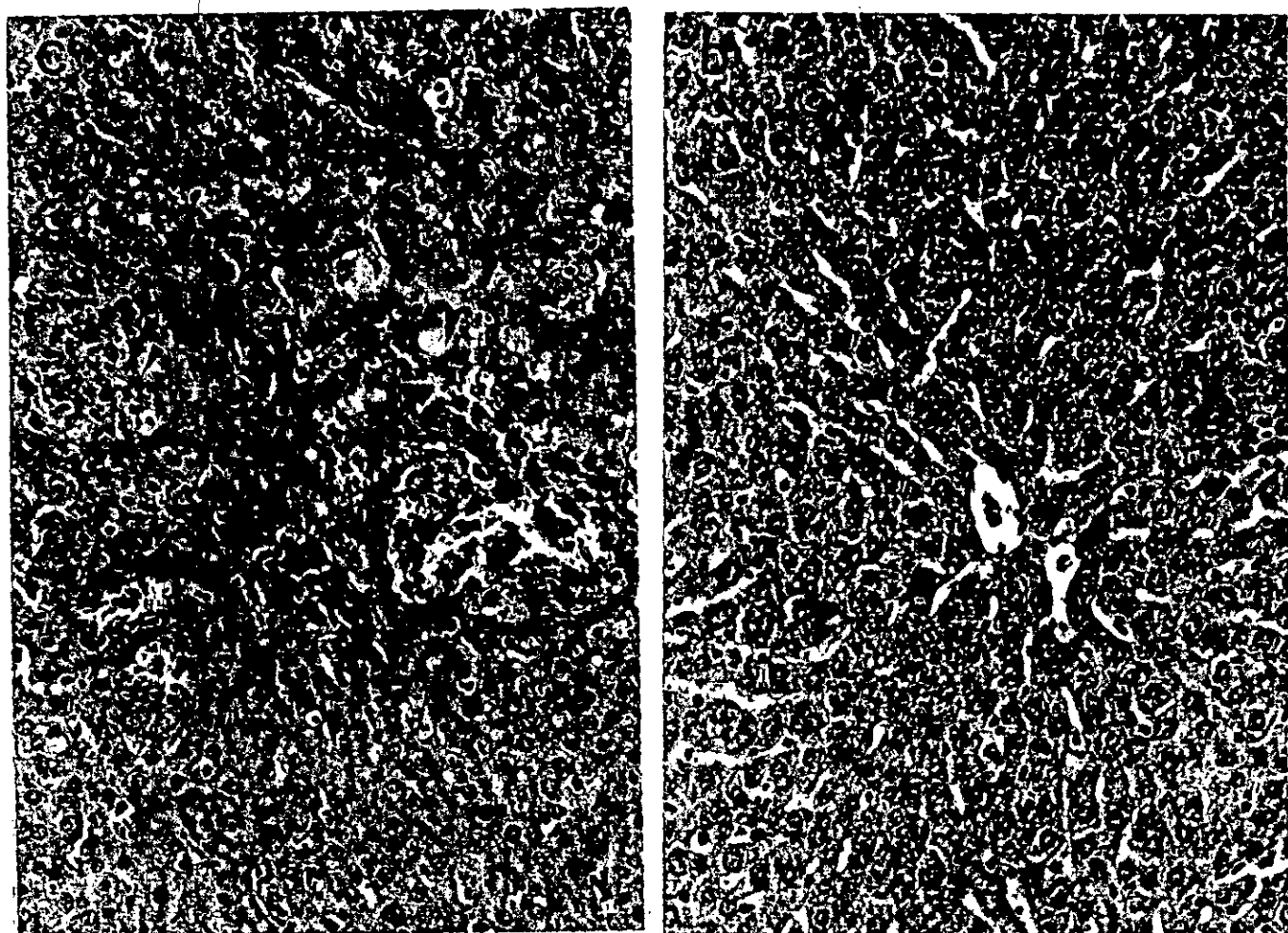


Fig.18 Effects of PCA on LPS induced liver damage. (A) Solvent control group (n=6). (B) Animals treated with LPS (5mg/kg) showed degeneration, swelling severe and neutrophil leukocyte infiltration (thin arrow), and congestion (thick arrow). (C) Animals pretreated with 25 mg/kg PCA, and then with LPS showed partially hepatocyte degeneration and swelling and infiltration of inflammatory leukocytes (thin arrow) and congestion remains. (D) Animals pretreated with 75 mg/kg PCA and then with LPS showed no pathological change ; hematoxylin/eosin staining; magnification 100 fold.

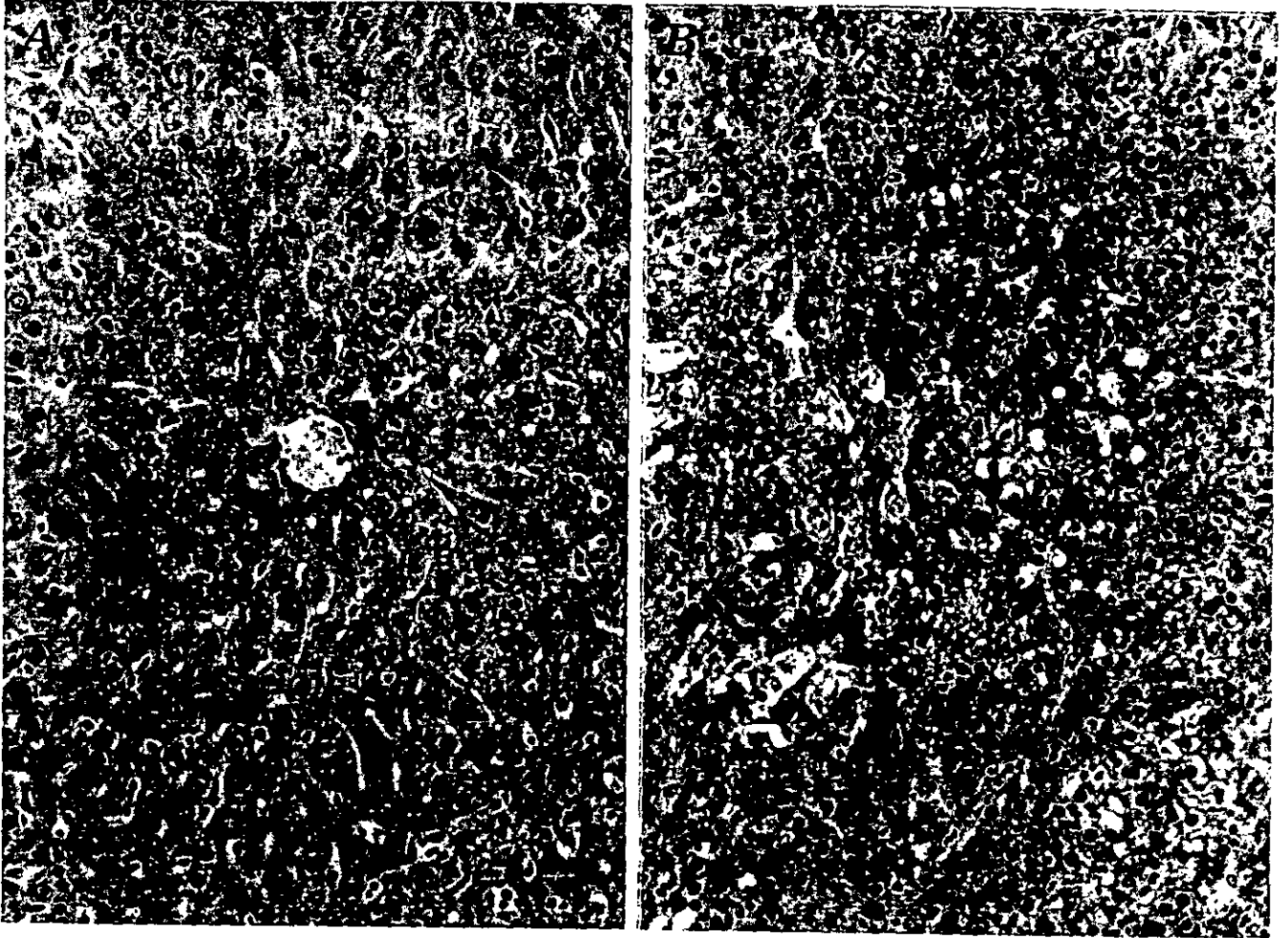


Fig.19. Effect of PCA on LPS-induced tyrosine phosphorylation by immunocytochemistry. (A) Solvent control group; (B) LPS (5 mg/kg) treated alone group showed numerous immunoreactive area (brown). (C) Animals pretreated with 25 mg/kg or (D) 75 mg/kg of PCA, and then with LPS showed markedly reduction of immunostain as (A).

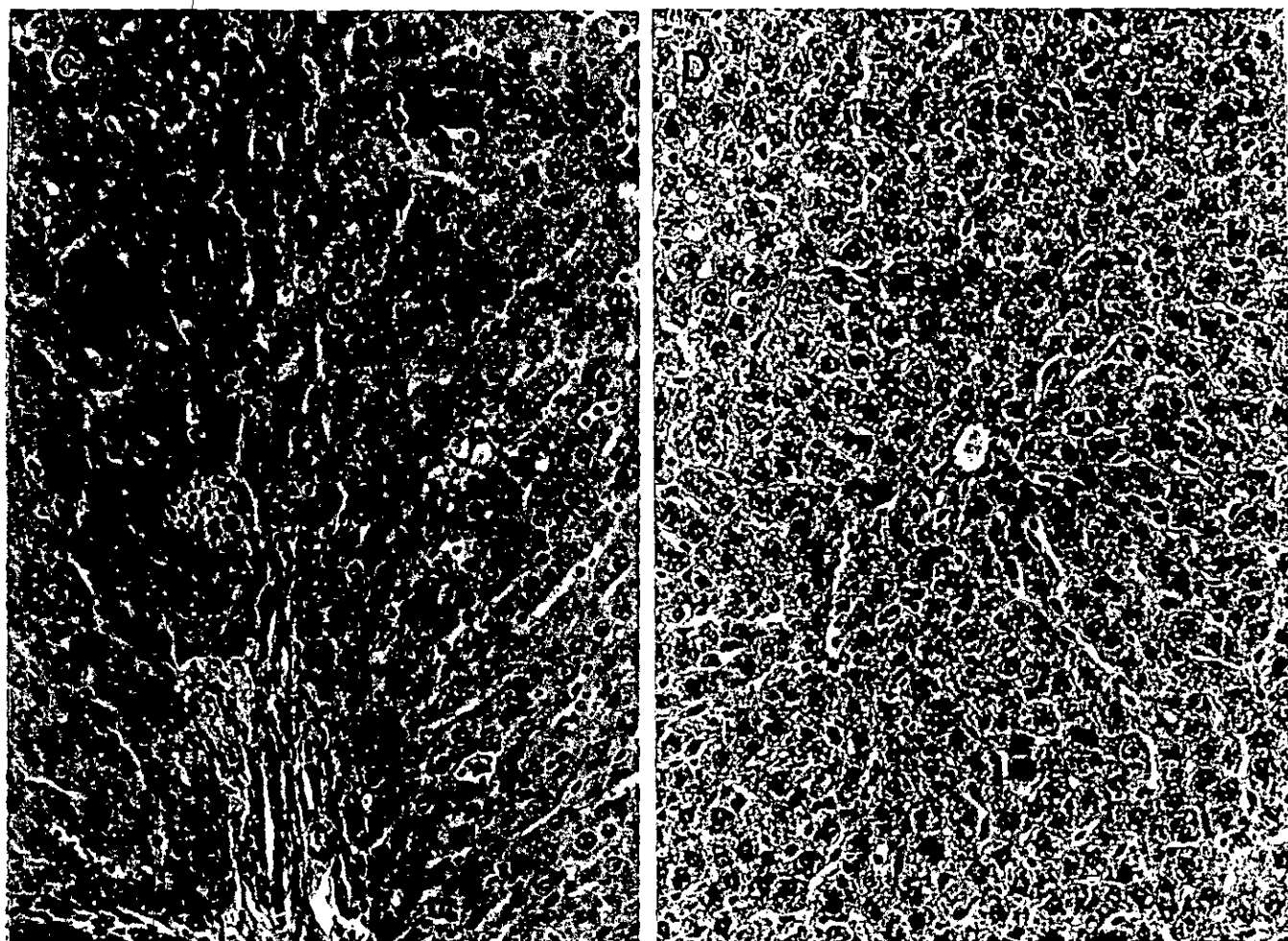


Fig.19. Effect of PCA on LPS-induced tyrosine phosphorylation by immunocytochemistry. (A) Solvent control group; (B) LPS (5 mg/kg) treated alone group showed numerous immunoreactive area (brown). (C) Animals pretreated with 25 mg/kg or (D) 75 mg/kg of PCA, and then with LPS showed markedly reduction of immunostain as (A).